

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Biología Molecular

**Estudio de la función epigenética de los factores
de transcripción *eyegone* y *twin of eyegone*
durante el desarrollo embrionario temprano de
*Drosophila melanogaster***

TESIS DOCTORAL
David Requena Soria
Madrid, 2014

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

**Estudio de la función epigenética de los factores
de transcripción *eyegone* y *twin of eyegone*
durante el desarrollo embrionario temprano de
*Drosophila melanogaster***

David Requena Soria
Licenciado en Biología

Directora de la tesis:
Natalia Azpiazu Torres

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
Madrid

Índice

Resumen.....	3
Summary	7
Introducción	11
I-1. La biología del desarrollo y la epigenética	13
I-2. La organización de la cromatina.....	15
I-2.1 La heterocromatina	17
I-2.1.A Mecanismos de ensamblaje de la heterocromatina.....	17
I-2.1.B La heterocromatina facultativa.....	19
I-2.1.C La heterocromatina constitutiva.....	20
I-2.1.C.a Los telómeros en <i>Drosophila melanogaster</i>	22
I-3. <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	25
I-4. Desarrollo embrionario temprano de <i>Drosophila melanogaster</i>	27
I-5. <i>eyegone</i> y <i>twin of eyegone</i>	29
Objetivos	33
Materiales y métodos.....	37
M-1. Estirpes de <i>Drosophila melanogaster</i> utilizadas	39
M-2. Clones de recombinación mitótica “ <i>en trans</i> ”	40
M-3. Generación de clones de la línea germinal.....	41
M-4. Sistema Gal4/UAS.....	43
M-5. Sistema Maternal Gal4/UAS-ARN interferente	44
M-6. Generación del anticuerpo α -Toe.....	45
M-7. Fijación de ovarios de hembras adultas y glándulas salivares larvares de tercer estadio ...	45
M-8. Obtención de cutículas embrionarias.....	46
M-9. Análisis <i>in vivo</i> de divisiones del blastodermo sincitial.....	47
M-10. Tinción inmunohistoquímica de embriones.....	47
M-11. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente con tinción inmunohistoquímica de embriones	48
M-12. Tinción inmunohistoquímica de cromosomas politénicos	49
M-13. Tinción de cromosomas mitóticos.....	50
M-14. <i>Western Blot</i> de embriones	50
M-15. Extracción de ADN genómico.....	51
M-16. Ensayo de PCR	52
M-17. RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR).....	53
R-1. Generación de la cepa doble mutante para <i>eyg</i> y <i>toe</i> : <i>FD2</i>	57
R-1.1 Estrategia	57
R-1.1 Análisis	58
R-1.1.A Análisis inmunohistoquímico	58
R-1.1.B Análisis molecular	60
R-2. Características fenotípicas del doble mutante <i>FD2</i>	61
R-3. <i>Eyg</i> y <i>Toe</i> tienen componente materno	64
R-4. Expresión embrionaria temprana de <i>eyg</i> y <i>toe</i>	65
R-5. <i>Eyg</i> y <i>Toe</i> se expresan durante la ovogénesis	66
R-6. La ausencia de <i>eyg</i> y <i>toe</i> produce fragmentaciones de cromatina y problemas en la secreción de la cutícula larvaria	68
R-7. Asincronía de las divisiones nucleares del blastodermo sincitial en embriones que se desarrollan en ausencia del componente materno de <i>eyg</i>	71
R-8. Daño en el ADN y celularización dependiente del tamaño nuclear en embriones que se desarrollan en ausencia del componente materno de <i>eyg</i>	75

R-9. La ausencia de componente materno de <i>eyg</i> provoca la deslocalización de la proteína centromérica CID.....	78
R-10. La ausencia de componente materno de <i>eyg</i> genera la aparición de regiones provistas de centrosomas huérfanos.	79
R-11. El sistema <i>Maternal-Gal4>UAS-ARN interferente</i> como alternativa a los clones de la línea germinal.....	81
R-12. En ausencia de componente materno de <i>eyg</i> y <i>toe</i> disminuye la cantidad de transcritos de secuencias de ADN satélite.....	83
R-13. La ausencia de <i>eyg</i> genera problemas en la estructuración de los telómeros	85
R-13.1 <i>eyg</i> se comporta como un supresor del efecto de posición telomérica.....	85
R-13.2 La ausencia de <i>eyg</i> produce figuras cromosómicas aberrantes.....	87
R-13.3 Disminución de abundancia de transcritos de regiones <i>HTT</i> y <i>TAS</i>	88
Discusión	91
D-1. <i>Eyg</i> y <i>Toe</i> están presentes en el componente materno y en el blastodermo sincitial	94
D-2. <i>eyg</i> y <i>toe</i> participan en la formación y/o mantenimiento de la heterocromatina constitutiva .	97
D-2.1 <i>Eyg</i> y <i>Toe</i> participan en el ensamblaje de los centrómeros.....	99
R-2.2 Transcripción de secuencias de ADN satélite	102
R-2.3 <i>Eyg</i> y <i>Toe</i> participan en el ensamblaje de los telómeros	105
R-3. <i>eyg</i> y <i>toe</i> ejercen papeles no redundantes durante el desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i>	108
Bibliografía.....	115
Anexo I: figuras suplementarias	127
Anexo II: abreviaturas.....	131
Anexo III: publicaciones	135

R esumen

El desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* comienza con la fusión de los pronúcleos masculino y femenino. A partir de ahí se producen de manera sincronizada 13 divisiones rápidas sin citocinesis que generan un blastodermo sincitial compuesto por unas 6000 células. Hasta este momento el embrión se ha de valer de los productos depositados por su progenitora en el componente materno durante la ovogénesis.

En este trabajo hemos puesto de manifiesto que los factores de transcripción codificados por los genes *eyegone* (*eyg*) y *twin of eyegone* (*toe*) son sintetizados durante la ovogénesis de la mosca y están presentes en el núcleo y citoplasma del blastodermo sincitial. Además, ambas proteínas se expresan en regiones formadas por heterocromatina constitutiva de cromosomas politénicos como son el cromocentro y los telómeros.

Los embriones que comienzan su desarrollo con cantidades reducidas de *eyg* y *toe* presentan fragmentaciones cromosómicas alrededor de sus núcleos, figuras cromosómicas aberrantes, reparto desigual de material genético y asincronía en sus ciclos de división mitóticos; éstos son fenotipos típicos de proteínas que participan en el mantenimiento y/o formación de dos estructuras heterocromáticas clave en las divisiones mitóticas: los centrómeros y los telómeros.

En este trabajo hemos analizado que *eyg* y *toe* participan en la transcripción de regiones satélites centroméricas y pericentroméricas que son procesadas posteriormente por la maquinaria del ARN-i. Además, en los embriones carentes de componente materno de ambos genes la señal de la proteína centromérica CID se muestra deslocalizada lo que indica que los centrómeros no se están ensamblando de manera apropiada.

La presencia de *Eyg* y *Toe* en los telómeros parece ser funcional ya que hemos comprobado que *eyg* se comporta como un supresor del efecto de posición telomérico y la reducción del componente materno de *eyg* y *toe* provoca la disminución de los niveles de transcrito de uno de los retrotransposones encargado de mantener la longitud de los telómeros en *Drosophila*: *HeT-A*.

Este trabajo demuestra que *eyg* y *toe* están implicados en la formación y/o mantenimiento de la heterocromatina constitutiva y que ambos genes parecen estar colaborando para realizar ciertas funciones durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

Summary

The embryonic development of *Drosophila melanogaster* begins with the fusion of the female and the male pronuclei. Later, 13 rapid divisions occur synchronously without cytokinesis, which generates a syncytial blastoderm of about 6000 cells. At this stage zygotic transcription is still inactive and the embryo is relying on the maternal components, accumulated during female oogenesis.

In this thesis, we have shown that the transcription factors encoded by the genes *eyegone* (*eyg*) and *twin of eyegone* (*toe*) are synthesized during the fly oogenesis and are present in the nucleus and the cytoplasm of the syncytial blastoderm. Furthermore, both proteins are localized in regions of constitutive heterochromatin in polytene chromosomes, such as the chromocenter and the telomeres.

Embryos that begin their development with reduced amounts of *eyg* and *toe* show chromosome fragmentation around their nuclei, aberrant chromosomal figures, unequal distribution of genetic material and asynchrony of their mitotic division cycles; these are typical phenotypes related to the lack of proteins involved in the maintenance and/or formation of two key heterochromatic structures during mitotic divisions: the centromeres and the telomeres.

We have shown that *eyg* and *toe* are involved in the transcription of centromeric and pericentromeric satellite regions, that are subsequently processed by the RNA-i machinery. Furthermore, the centromeric protein Centromere Identifier (CID) is mislocalized in embryos lacking the maternal component of both genes, suggesting that centromeres are not being assembled properly.

The presence of Eyg and Toe in the telomeres seems to be functional, as we have seen that *eyg* acts as a suppressor of the telomeric position effect. The reduction of *eyg* and *toe* maternal component causes a decrease in the transcript levels of one of the retrotransposons responsible for maintaining telomere length in *Drosophila*: *HeT-A*.

In this thesis, we have demonstrated that *eyg* and *toe* are involved in the formation and/or maintenance of the constitutive heterochromatin and that both genes seem to collaborate to perform certain functions during *Drosophila melanogaster* development.

I Introducción

I-1. La biología del desarrollo y la epigenética

Una de las características propias de la materia viva es la reproducción o capacidad de generar descendientes que perpetúen una propia especie. Los seres vivos se valen de diferentes estrategias de reproducción. Algunos organismos son capaces de formar un nuevo individuo a partir de una única célula, proceso conocido como reproducción asexual. Sin embargo, otros seres vivos se reproducen de manera sexual y precisan de la fusión de dos células sexuales o gametos procedentes de cada uno de los progenitores que resulta en la formación del cigoto o célula huevo. A partir de ese momento el cigoto sufre un conjunto de procesos ontogenéticos que acaba desarrollando el individuo adulto. Algunos de estos procesos son la proliferación y diferenciación celular, la morfogénesis, el control del crecimiento, la regeneración y homeostasis de tejidos adultos. Todos estos procesos suponen el objeto de estudio de la Biología del Desarrollo.

Un organismo presenta la misma carga genética en todas y cada una de las células que lo componen, por lo tanto son necesarios mecanismos de control de la expresión génica que provoquen la diferenciación de células indiferenciadas a través de la activación o represión de genes concretos.

La epigenética (del griego *epi*:- “por encima de” o “sobre”, la genética) es la disciplina que se encarga de estudiar los fenómenos que producen cambios heredables en la actividad génica que no implican modificaciones en la secuencia del ADN (Holliday, 1987). El término epigenética fue acuñado por primera vez por Conrad Hal Waddington en 1939 quien la definió como “el conjunto de las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan lugar al fenotipo” (Waddington, 1939). Aunque el origen del concepto puede encontrarse ya en Aristóteles quien defendió en su libro *La Generación de los Animales* (350 A.C.) que los animales no procedemos de cuerpos minúsculos completamente formados, lo que se denominó teoría de la preformación, si no que nos desarrollamos a partir de materia amorfa, proceso conocido como epigénesis (Fig I-1).

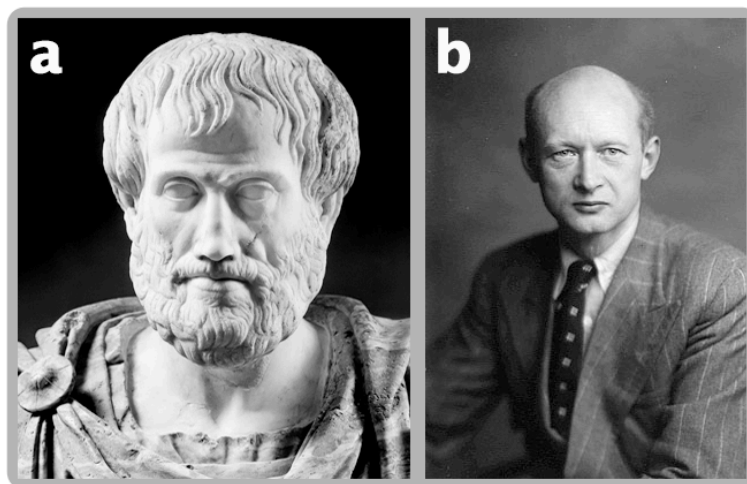


Figura I-1. (a) Aristóteles (384-322 A.C.) defendió en su libro *La Generación de los Animales* (350 A.C.) la teoría de la epigénesis que apoyaba el desarrollo de los organismos a partir de la materia amorfa . **(b)** Conrad Hal Waddington (1905-1975) acuñó por primera vez el término epigenética para definir “el conjunto de las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan lugar al fenotipo”. *Godfrey Argent Studio/Royal Society.*

La epigenética trata de responder cuestiones que la genética clásica por sí sola es incapaz de explicar como son la ingente variedad fenotípica presente dentro de una misma población o cómo gemelos monocigóticos o animales clonados presentan diferentes fenotipos y diferentes susceptibilidades a sufrir enfermedades aún presentando la misma dotación génica (Humpherys et al., 2001, Fraga et al., 2005).

En las últimas décadas se está especulando mucho con la idea de que diferentes factores ambientales vividos por generaciones precedentes pueden afectar a las siguientes generaciones. Factores como la dieta, el tabaquismo, las radiaciones UV recibidas, etc. podrían estar provocando cambios heredables a nivel de expresión génica sin que se produzcan cambios a nivel de secuencia nucleotídica. Estos cambios desencadenarían el “encendido” o

“apagado” de genes que provocan que ciertas personas sean más susceptibles que otras a padecer una enfermedad o a presentar un rasgo físico concreto.

Los mecanismos de los que se vale la epigenética para provocar estos cambios en la actividad génica son la metilación del ADN y la modificación postraducciona de histonas (ver más adelante). Estos mecanismos provocan que la cromatina adquiera una conformación más compacta que silencia o apaga los genes que contiene o una conformación laxa que permite la expresión o enciende los genes presentes en ella (Fig. I-2 a).

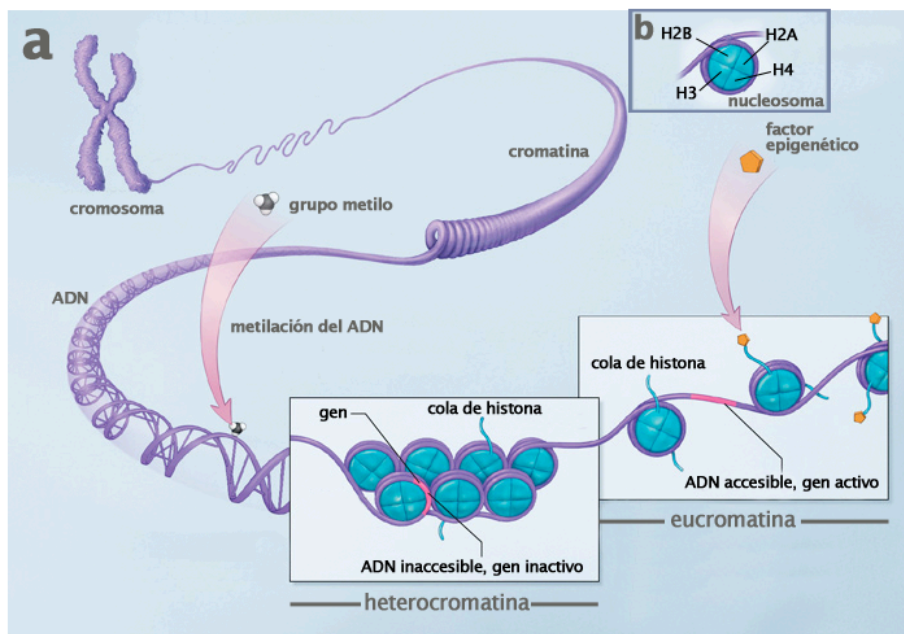


Figura I-2. Mecanismos epigenéticos. (a) Figura esquemática que representa los mecanismos epigenéticos que controlan la actividad génica. Diferentes factores pueden producir metilaciones en el ADN o modificaciones postraduccionales de las colas N-terminales de las histonas. Estos hechos desencadenan cambios en el nivel de compactación de la cromatina que hacen expresar o silenciar diferentes genes. Aquella cromatina que adquiere una conformación

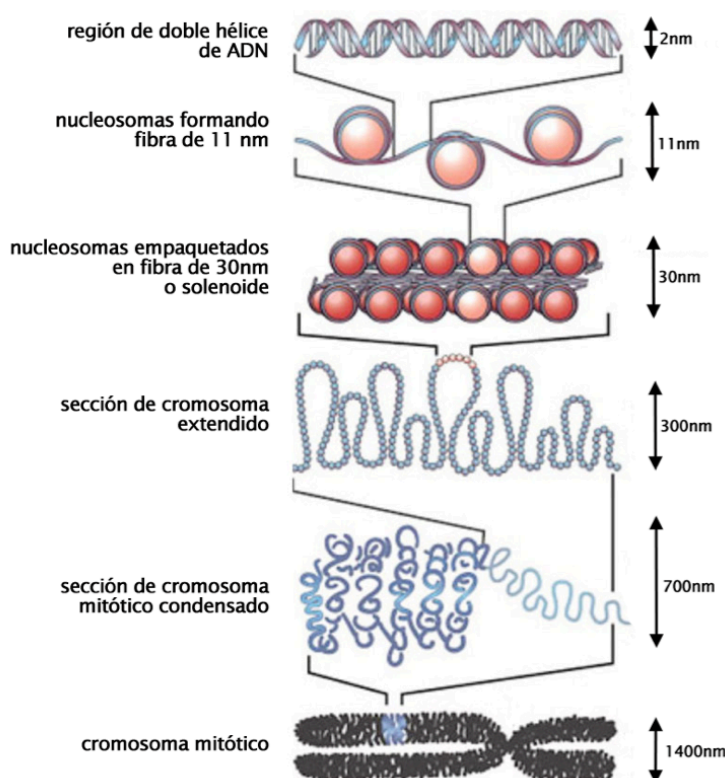
que resulta inaccesible a la maquinaria de transcripción se denomina heterocromatina mientras que aquella cromatina que presenta una conformación poco condensada y accesible a la maquinaria de transcripción se denomina eucromatina. (b) Representación esquemática de un nucleosoma constituido por 146 pb de ADN de doble cadena y un octámero de histonas que consiste en dos moléculas de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Modificado de <http://commonfund.nih.gov/epigenomics>.

I-2. La organización de la cromatina

El material genético de los organismos eucariotas está organizado en forma de cromatina. La cromatina es el complejo formado por la doble hélice de ADN y proteínas accesorias. Estas proteínas son de naturaleza básica y las más abundantes son las histonas, proteínas especialmente básicas y altamente conservadas a lo largo de la evolución. La unidad

estructural de la cromatina es el nucleosoma, compuesto por un núcleo proteico de histonas y 146 pares de bases (pb) de doble hélice de ADN. El octámero de histonas lo constituyen dos moléculas de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Fig. I-2 b).

Se pueden distinguir diferentes niveles de compactación de la cromatina. La “fibra de 11 nm” está formada por sucesivos nucleosomas separados por un fragmento de ADN espaciador que garantiza flexibilidad a la fibra de cromatina y que se asocia con la histona H1. El segundo nivel de empaquetamiento lo constituye la “fibra de 30 nm” que consiste en grupos de nucleosomas apilados unos sobre otros adoptando formaciones regulares gracias a la acción de la histona H1. El nivel máximo de empaquetamiento se presenta en el cromosoma metafásico (Fig. I-3) (Alberts, 2007).



Al teñir el material genético con reactivos que se intercalan en el ADN se visualizan diferentes regiones en función del tipo de tinción que presenta la cromatina. Aquellas regiones que se tiñen fuertemente se denominan heterocromatina y las regiones de tinción débil corresponden a la eucromatina.

La eucromatina presenta una conformación laxa o poco accesible a los factores reguladores de la transcripción. La heterocromatina, sin embargo, es aquella cromatina cuya conformación compacta dificulta

condensada de la cromatina y que, por lo tanto, es

Figura I-3. Organización de la cromatina. Figura esquemática que representa los diferentes niveles de empaquetamiento de la cromatina. La doble hélice de ADN se enrolla alrededor de un octámero de histonas para formar el nucleosoma. Las series de nucleosomas forman la fibra de 11 nm y ésta, a su vez, se pliega para formar la fibra de 30 nm o solenoide. El nivel máximo de empaquetamiento se encuentra en el cromosoma mitótico, en concreto en la fase metafásica. Modificado de (Alberts, 2007).

el acceso de la maquinaria transcripcional (Fig. I-2 a).

I-2.1 La heterocromatina

El plegamiento del ADN alrededor de las histonas que constituye la cromatina y la estructura que ésta adquiere a lo largo del ciclo celular juegan un papel fundamental en la biología de los organismos eucariotas. La regulación de la conformación de la cromatina es importante tanto a nivel local como global. La conformación heterocromática puede controlar la expresión de un único gen o llegar a provocar cambios en grandes dominios cromosómicos o incluso en cromosomas enteros.

I-2.1.A Mecanismos de ensamblaje de la heterocromatina

Al enrollarse el ADN alrededor del octámero de histonas éstas dejan sus conservados extremos amino expuestos por lo que son susceptibles de sufrir diferentes modificaciones postraduccionales. Las modificaciones más frecuentes son las acetilaciones y metilaciones (Jenuwein y Allis, 2001). La heterocromatina es rica en marcas de histonas metiladas e hipoacetiladas y normalmente está asociada a la presencia de la proteína HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) (Grewal y Jia, 2007, Bannister y Kouzarides, 2011). Esta proteína, descubierta en *Drosophila*, presenta homólogos en multitud de especies desde *Schizosaccharomyces pombe* (Swi6, Chp2 y Chp1) hasta humanos (HP1 α , HP1 β y HP1 γ). Cada tipo de proteína HP1 interactúa con diversos factores y está implicada en diferentes aspectos de la estructura y función de la heterocromatina. Estas proteínas presentan un dominio de tipo cromodominio en la extremo N-terminal, con el que se unen a residuos metilados de histonas, una región espaciadora o *hinge* y otro dominio de tipo *chromoshadow* a través del cual multimerizan (Huisinga et al., 2006).

La heterocromatina presenta un perfil característico de modificaciones postraduccionales de las histonas que se distingue por un alto grado de hipoacetilación y de metilación de los

residuos lisina 9 y lisina 27 de la histona H3 (H3K9me y H3K27 respectivamente) mientras que la eucromatina está caracterizada por la presencia de la acetilación de la histona H4 y la metilación de la histona H3 en el residuo lisina 4 (H3K4me) (Grunstein, 1998, Litt et al., 2001, Nakayama et al., 2001, Noma et al., 2001, Cam et al., 2005, Martin y Zhang, 2005). Estas marcas en las histonas actúan como anclaje molecular para atraer a proteínas que son capaces de modificar la cromatina o reclutar otras que lo harán (Martin y Zhang, 2005). Por ejemplo, la marca H3K9me supone un sitio de unión para el cromodominio de HP1/Swi6 (Bannister et al., 2001, Lachner et al., 2001, Nakayama et al., 2001). En *D. melanogaster*, se produce la desmetilación del residuo H3K4 por la demetilasa Su(var)3-3 (Rudolph et al., 2007) y a continuación la metiltransferasa Su(Var)3-9 metila sucesivamente el residuo H3K9 hasta ser trimetilado. Este hecho provoca la unión de HP1 a la cromatina y el posterior reclutamiento de la metiltransferasa Su(Var)3-9 que genera una nueva marca en la histona adyacente y, por lo tanto, un nuevo sitio de unión para HP1. De esta manera se va continuando el proceso de heterocromatinización (Rea et al., 2000, Jenuwein y Allis, 2001) (Fig. I-4). En *Schizosaccharomyces pombe*, Clr4 (*Cryptic loci regulator 4*) crea la marca H3K9me independientemente de Swi6 pero la extensión de la metilación de H3K9 en el dominio sí es dependiente de Swi6 (Hall et al., 2002). HP1/Swi6 se multimerizan a través de su dominio de tipo *chromoshadow* (Brasher et al., 2000, Cowieson et al., 2000). Este hecho unido al a la habilidad de estas proteínas a unirse a otros factores remodeladores de la cromatina como histonas-deacetilasas sugiere que HP1/Swi6, al unirse a H3K9me, sirven como plataforma de ensamblaje para factores remodeladores de la cromatina y están implicados en el mantenimiento y extensión de la heterocromatina (Hall et al., 2002, Yamada et al., 2005).

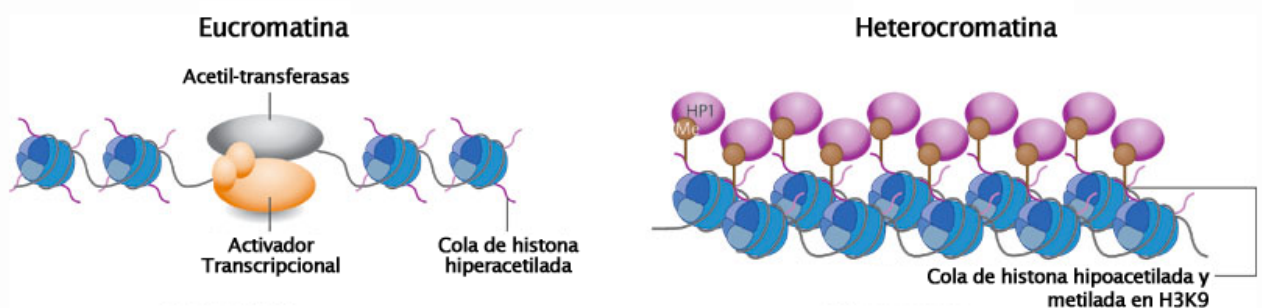


Figura I-4. Eucromatina versus heterocromatina. Figura esquemática que representa los dos estados cromatínicos. La conformación laxa de la eucromatina (a la izquierda) permite el acceso de activadores transcripcionales y se caracteriza por la presencia de residuos hiperacetilados de las colas de las histonas creados por encima acetil-transferasas. En cambio, la heterocromatina presenta una conformación compacta que impide el acceso de la maquinaria de transcripción y es rica en residuos H3K9 hipoacetilados y metilados a los que se une HP1. (Grewal y Elgin, 2007)

La heterocromatina se divide en dos tipos: la heterocromatina facultativa y la heterocromatina constitutiva. La heterocromatina facultativa supone un mecanismo de regulación de la expresión génica, por lo que su condición es reversible a eucromatina cuando el organismo así lo requiere. Sin embargo, la condición heterocromática de la heterocromatina constitutiva es irreversible y se asocia con regiones estructuralmente muy importantes para los núcleos celulares como son los telómeros y los centrómeros.

I-2.1.B La heterocromatina facultativa

La heterocromatina desempeña una importante función en la regulación epigenética de la expresión génica durante el desarrollo y la diferenciación celular. Este es el caso de la heterocromatina facultativa. Ejemplos de este tipo de control de la expresión génica son la heterocromatinización que inactiva la expresión de genes reguladores del desarrollo como los genes homeóticos en *Drosophila* y mamíferos (Cavalli, 2002) y la compensación de dosis génica en las hembras de mamíferos que implica la inactivación heterocromática de uno de los dos cromosomas X de las células somáticas (Avner y Heard, 2001). El efecto represivo de la heterocromatina sobre la expresión génica fue estudiado por primera vez en *Drosophila*. En este organismo, se vio que la translocación de un gen a una zona heterocromática producía un fenotipo variegado. Este fenotipo se debe al silenciamiento que se genera por la expansión de la zona heterocromática que acaba por envolver y, por tanto, por reprimir el gen en algunas células mientras que en otras el gen no llega a ser cubierto ni reprimido y se expresa con normalidad. Este fenómeno se denomina variegación por efecto de posición (*Position Effect Variegation*: PEV) y ha permitido el descubrimiento de muchos genes implicados en la formación de la heterocromatina gracias a que mutaciones en los mismos producen un potenciamiento o una supresión de esta variegación (Ebert et al., 2006) (Figura I-5).

A parte de las modificaciones de histonas, los vertebrados recurren a la metilación del ADN, en concreto de las citosinas de las islas CpGs, para controlar la expresión de ciertos genes. La metilación de estas regiones se asocia con estados silenciados ya que ciertos represores

transcripcionales reconocen estos residuos y se unen a ellos provocando cambios conformacionales de la cromatina que dificultan la unión de factores de transcripción (Jones et al., 1998b).

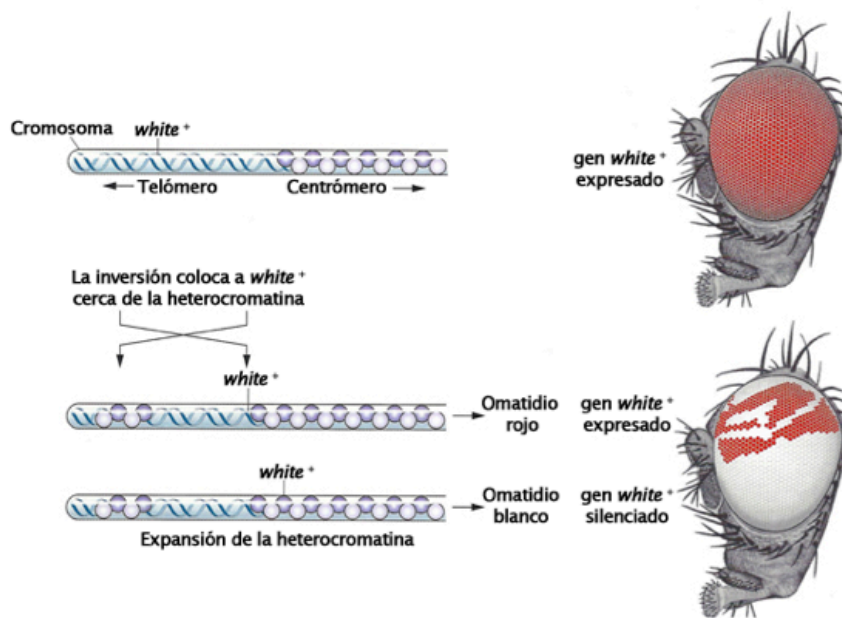


Figura I-5. Variegación por efecto de posición. Este fenómeno ocurre cuando una inversión génica coloca un gen situado en una región eucromática, en este caso *white*⁺ que proporciona color rojo a los omatidios, cerca de una región heterocromática. En algunas células la heterocromatina se extenderá llegando a cubrir el gen y, por tanto, silenciándolo (células blancas), mientras que en otras células no se llegará a cubrir y se expresará con normalidad (células rojas). Cuando se dan estos hechos se dice que el ojo presenta un fenotipo variegado. Modificado de discoveryandinnovation.com.

I-2.1.C La heterocromatina constitutiva

La heterocromatina constitutiva se asocia con los telómeros y las regiones centroméricas y pericentroméricas (Elgin, 1996). De una manera más concreta, esta heterocromatina consiste en ADN altamente repetido como las secuencias satélites y ADN medianamente repetido que incluye elementos transponibles y retrovirus. Estas regiones presentan un pobre número de genes cuya función normal está sujeta a una correcta estructura heterocromática (Lu et al., 2000).

Por lo general, son regiones que se replican en fase S tardía y presentan una reducida frecuencia de recombinación, hecho que les aporta estabilidad. Las estructuras que presentan este tipo de conformación heterocromática son los centrómeros y los telómeros. Es necesario estas regiones se estructuren correctamente para que se produzcan de manera apropiada la

cohesión entre cromátidas hermanas y la segregación cromosómica posterior (Grewal et al., 1998, Bernard et al., 2001).

En los últimos años una gran cantidad de trabajos han sugerido que la transcripción de ARN no codificante juega un importante papel en el establecimiento de la heterocromatina constitutiva (Lu y Gilbert, 2007, Probst et al., 2010).

En levaduras (*Schizosaccharomyces pombe*) se ha visto que la maquinaria del ARN interferente interviene en el proceso de formación de la heterocromatina (Fig I-6). Las secuencias repetidas centroméricas son transcritas a ARN de doble cadena gracias a la transcripción bidireccional de estas secuencias, al plegamiento del ARN de cadena sencilla o a la acción de una ARN polimerasa dependiente de ARN que polimeriza la segunda hebra utilizando la primera como molde. El ARN de doble cadena es procesado en pequeños ARNs que se incorporan a complejos que contienen proteínas de tipo Argonauta. Después, la doble cadena de ARN es tratada por estas proteínas y se generan siARNs (*small interfering* ARN). El complejo Argonauta carga el siARN, éste se asocia por complementariedad de bases con el ARN naciente y dirige hasta allí a proteínas pertenecientes a la maquinaria de remodelación de la cromatina como metil-transferasas (Clr4) e histonas deacetilasas, hecho que desencadena la heterocromatinización de la región (Volpe et al., 2002, Volpe et al., 2003, Verdel et al., 2004, Kato et al., 2005).

En vertebrados también parece haber una relación directa entre transcripción y formación de heterocromatina, puesto que se ha descrito que es necesaria la transcripción de ciertos de ARNs del cromosoma X de ratón para que se de la inactivación del cromosoma X (Avner y Heard, 2001, Cohen y Lee, 2002).

En *Drosophila* se ha demostrado que regiones de ADN satélite centroméricas y pericentroméricas son transcritas y procesadas por la maquinaria del ARN-i (Usakin et al., 2007). Resultados previos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que existe una vinculación entre la transcripción del ARN satélite llevado a cabo de la ARN polimerasa II y el correcto ensamblaje de la heterocromatina pericentromérica (Salvany et al., 2009).

Además de éste, otros trabajos realizados en ratón y *Drosophila* han establecido posibles modelos de formación de heterocromatina basados en transcripción de secuencias no-

codificantes mediados por factores de transcripción específicos (Salvany et al., 2009, Bulut-Karslioglu et al., 2012).

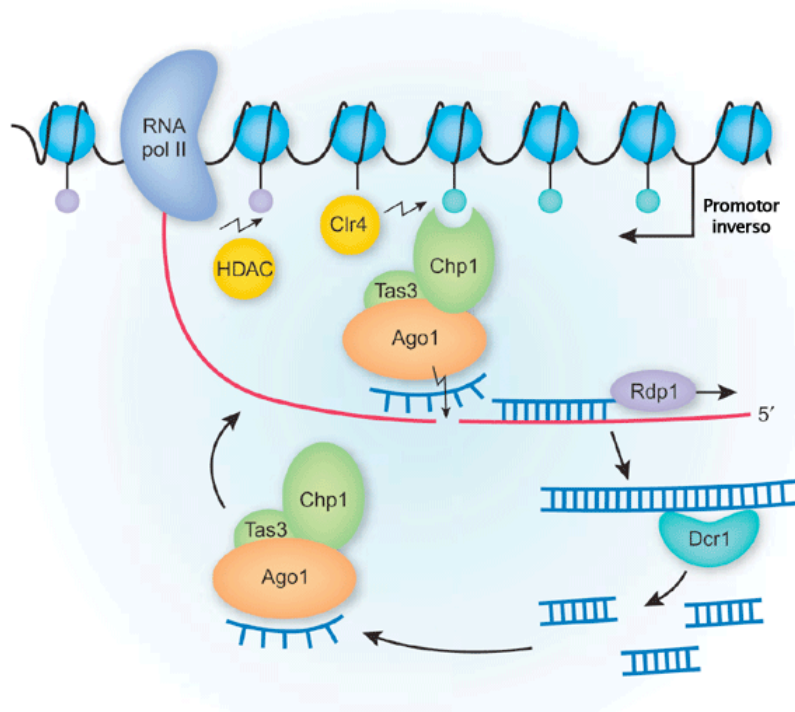


Figura I-6. Formación de heterocromatina en levaduras.

Figura esquemática que representa el proceso de formación de heterocromatina centromérica en levaduras (*S. Pombe*). Las secuencias repetidas centroméricas son transcritas a ARN de doble cadena por la acción de la ARN polimerasa II (RNA pol II), de una ARN polimerasa dependiente de ARN (Rdp1) y por transcripción bidireccional. El ARN de doble cadena es procesado en pequeños ARNs que se incorporan a complejos que contienen proteínas de tipo Argonauta (Ago1, Tas3 y Chp1). Después, la doble cadena de ARN es tratada por proteínas Dicer (Dcr1) y se generan siARNs.

El complejo Argonauta carga el siARN, éste se asocia por complementariedad de bases con el ARN naciente y dirige hasta allí a la maquinaria de remodelación de la cromatina como metil-transferasas (Clr4) e hitonas deacetilasas (HDAC), hecho que desencadena la heterocromatinización de la región. Modificado de (Ekwall, 2007).

I-2.1.C.a Los telómeros en *Drosophila melanogaster*

Además de los centrómeros, los telómeros también se encuentran formados por heterocromatina constitutiva. Estas estructuras cumplen dos funciones clave en las células eucariotas: estabilizan y protegen el final de los cromosomas. Por una parte los telómeros evitan que las células reconozcan los finales de los cromosomas como roturas de ADN de doble cadena ya que si esto sucediera se generaría un proceso de reparación cuyo resultado sería deletéreo para la célula (Palm y de Lange, 2008). Además, los telómeros estabilizan los cromosomas evitando que estos se acorten tras sucesivas rondas de replicación del ADN debido al “problema de la replicación final”, denominado así por la incapacidad de las polimerasas de ADN de completar la replicación del final del cromosoma (Olovnikov, 1971,

Watson, 1972). La mayoría de eucariotas resuelven este problema con la presencia de una ribonucleoproteína denominada telomerasa. Esta enzima se encarga de añadir repeticiones *de novo* a la región telomérica (Morin, 1989). Sin embargo, la telomerasa ha sido perdida varias veces en la evolución de plantas e insectos (Pich y Schubert, 1998, Fujiwara et al., 2005) y *Drosophila melanogaster* supone un ejemplo de ello.

En *Drosophila* la longitud de los telómeros se mantiene gracias a la transposición dirigida de retrotransposones no-LTR (*Long Terminal Repeat*) específicos de telómero que están presentes al final del cromosoma. Estos retrotransposones son *HeT-A*, *TART* y *TARE*. Los telómeros en *Drosophila* están compuestos por tres dominios (Fig. I-7): en el extremo del cromosoma se encuentra el dominio *capping* o *cap* telomérico, a continuación está el dominio conocido como HTT (*HeT-A*, *TART* y *TARE*) compuesto por los retrotransposones repetidos en tándem y después está el dominio constituido por secuencias repetidas que se denomina TAS (*Telomere Associated Sequences*).

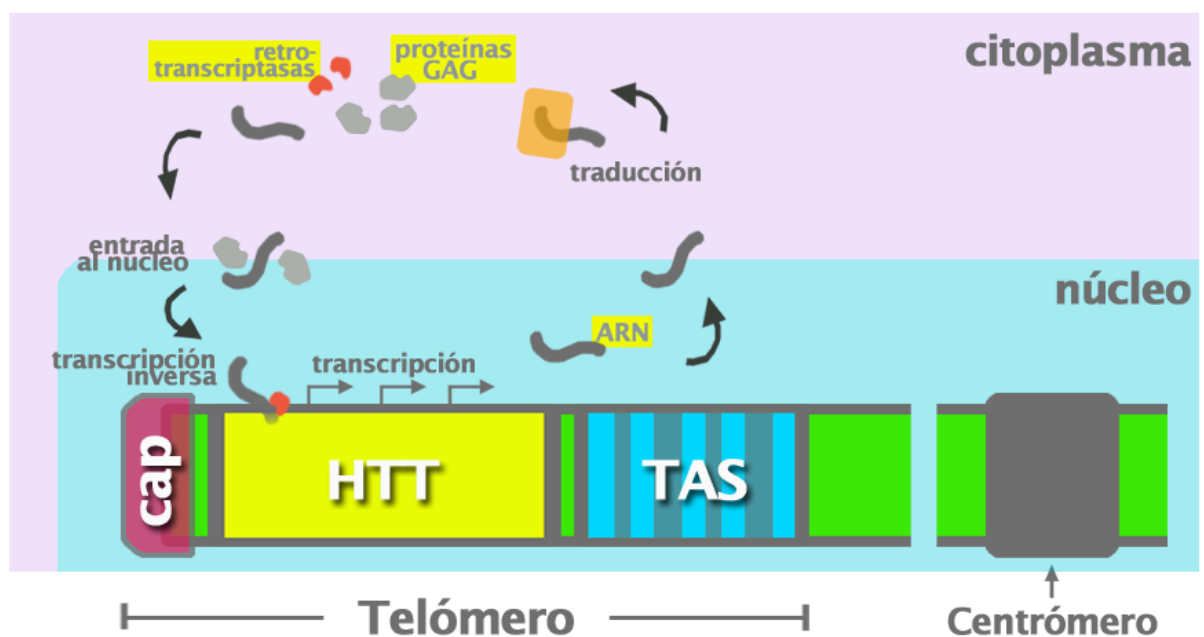


Figura I-7. Dominios teloméricos y mecanismo de elongación de los telómeros en *Drosophila melanogaster*. Figura esquemática que representa los diferentes dominios teloméricos de *D. melanogaster* y su sistema de elongación de telómeros basado en la transposición de los retrotransposones *HeT-A*, *TART* y *TARE*. El telómero se divide en 3 dominios: el dominio más terminal es el *cap* telomérico (en rojo) compuesto por una serie de proteínas que evitan que el final del cromosoma sea reconocido como rotura de doble cadena. A continuación, se encuentra el dominio que contiene los retrotransposones repetidos en tándem o HTT (en amarillo) y después se localizan las secuencias repetidas asociadas al telómero o TAS (en azul). El sistema de elongación consiste en la transcripción de los retrotransposones a ARN. Este ARN sale al núcleo donde es traducido a proteínas GAG y retro-transcriptasas. Las proteínas GAG facilitan la entrada al núcleo del ARN y éste se acopla al final del cromosoma donde es transcrito de manera inversa a ADN por las retrotranscriptasas.

El dominio *cap* telomérico está formado por un conjunto de proteínas que protegen el final del cromosoma evitando que éste sea reconocido como rotura de doble cadena de ADN por la maquinaria de reparación del material genético. La falta de función de genes que codifican para proteínas que forman este dominio provocan que cromosomas homólogos no lleguen a segregarse correctamente y queden unidos por los telómeros, fenómeno que se conoce como fusión telomérica (Raffa et al., 2011). Este dominio se compone de cuatro proteínas que se encuentran exclusivamente al final de los cromosomas: HOAP (*HP1-ORC associated protein*), HipHop (*HP1-HOAP interacting protein*), Moi (*Modigliani*) y Ver (*Verrocchio*) (Raffa et al., 2011). Además existen otras proteínas de este dominio que no sólo aparecen en los telómeros y que también son requeridas para mantener la estabilidad cromosómica; algunas de estas proteínas son HP1a, ATM, ATR, Woc o UbcD1 (Cenci et al., 1997, Perrini et al., 2004, Bi et al., 2005, Raffa et al., 2005).

El dominio HTT está implicado en la regulación de la longitud del telómero y está compuesto exclusivamente por los retrotransposones *HeT-A*, *TART* y *TAHRE* repetidos en tándem en disposición cabeza-cola con sus colas oligo(A) dirigidas hacia el centrómero. Estos poseen uno o dos marcos de lectura abierta flanqueados por regiones UTR 3' y 5' (Silva-Sousa et al., 2012). Los marcos de lectura abierta corresponden a la retro-transcriptasa y a la proteína estructural GAG. *HeT-A* es el componente principal del dominio HTT y es el único de los tres que sólo codifica para GAG, por lo que no es autónomo ya que precisa de la retro-transcriptasa de otro de los elementos móviles (Pardue et al., 1996).

El mecanismo de transposición no se conoce completamente aunque se cree que es el siguiente (Fig. I-7): cuando la elongación del telómero es necesaria los retrotransposones se transcriben a ARN gracias a la actividad promotora localizada en el 3' UTR del retrotransposón que se encuentra *upstream*. El ARN servirá como ARN mensajero y como intermediario de la transposición: este ARN sale al citoplasma donde es traducido a proteínas GAG, que actúan de transportadores del ARN, y a retro-transcriptasas, que transcribirán de manera inversa el ARN a ADN. Estas proteínas y el recién traducido ARN forman un complejo ribonucleoproteico que es transportado al núcleo. Una vez allí, las proteínas GAG de *HeT-A* direccionan el complejo al final del cromosoma donde se acopla y el ARN sirve como molde para la transcripción inversa que realiza la retro-transcriptasa. Una vez finalizada la síntesis de la primera hebra del ADN, la segunda es creada por la maquinaria de reparación del material genético completándose así la

adición de un nuevo retrotransposón (Mason et al., 2008).

Dentro del telómero y antes del primer gen eucromático se encuentra el dominio TAS, una región presente en multitud de especies, desde levaduras hasta humanos y que está compuesta por secuencias dinámicas y altamente polimórficas de ADN (Pryde et al., 1997). El papel de este dominio está asociado a regular epigenéticamente la formación de heterocromatina en los telómeros. Estas secuencias contribuyen a silenciar genes presentes en las cercanías del dominio. Este silenciamiento se da sólo hacia el final del cromosoma y se denomina efecto de posición telomérica (*Telomere Position Effect*: TPE) (Mason et al., 2008).

I-3. *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral se realizó utilizando como modelo de estudio *Drosophila melanogaster*. Este organismo modelo fue empleado como tal por primera vez por Thomas Hunt Morgan a principios del siglo XX. Desde entonces, su extendido uso como animal de laboratorio ha desarrollado un profundo conocimiento que ha llevado a generar infinidad de herramientas, tanto genéticas como moleculares.

Se trata de un insecto holometábolo, es decir, que sufre una metamorfosis completa, y que presenta características muy ventajosas como animal modelo; algunas de estas características son: ciclo vital muy corto (Fig I-8); pequeño tamaño, que permite almacenar gran número de individuos en poco espacio; mantenimiento poco costoso; número bajo de cromosomas, tan solo 4; baja redundancia genética, la mayoría de las veces basta mutar un gen para descubrir su función; presencia de cromosomas balanceadores (con gran número de reordenaciones genéticas) que impiden la recombinación meiótica permitiendo conservar estirpes a lo largo del tiempo; su genoma, ya secuenciado (Adams et al., 2000), ha puesto de manifiesto que existe un 60% de homología genética con el genoma humano.

Todas estas características han hecho de *Drosophila* uno de los animales modelo más utilizados en la investigación científica, tanto es así que en la actualidad podemos hacer uso de herramientas ya desarrolladas tan útiles como aquellas que permiten expresar cualquier gen en un patrón espacio-temporal concreto, eliminar la expresión de un gen con un ARN de interferencia, mutar un gen de manera dirigida, etc.

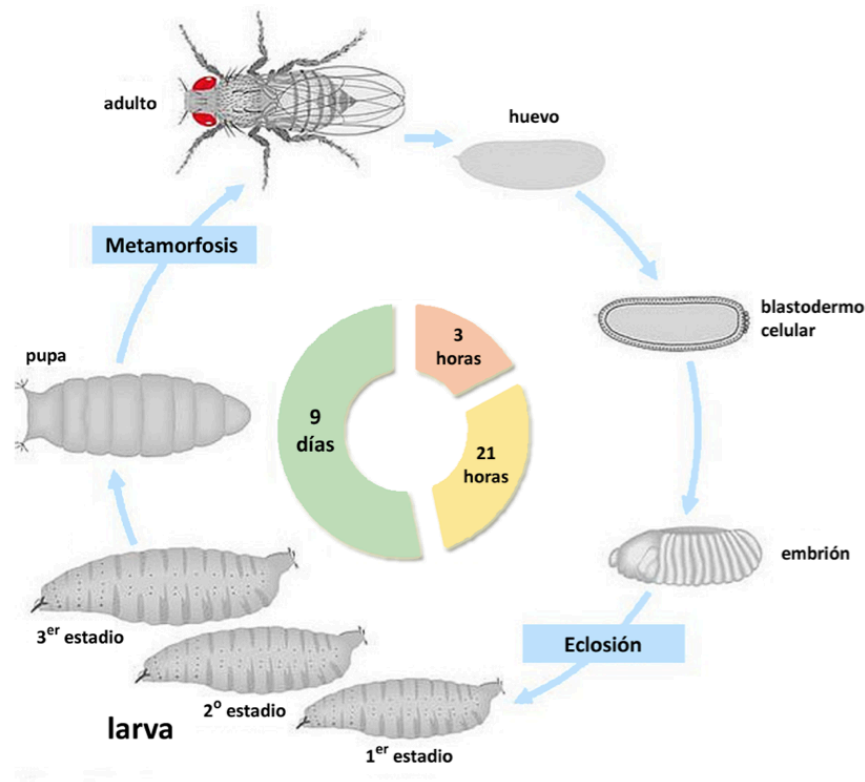
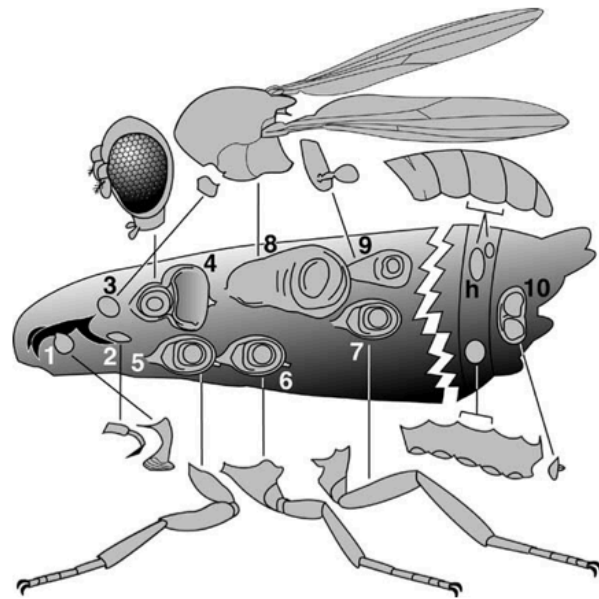


Figura I-8. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*. El ciclo vital de *D. melanogaster* dura 10 días a 25°C. Consta de una fase embrionaria, tres estadios larvarios y una fase pupal durante la cual se produce la metamorfosis completa que finaliza con la eclosión del adulto. Tomado de B. Staveley.

Como se observa en la figura I-8 el ciclo de la mosca de la fruta se completa en unos 10 días a 25°C y consta de diferentes fases. La primera es la fase embrionaria que dura 24 horas y termina con la eclosión del huevo. A continuación está la fase larvaria, que comprende tres estadios separados entre sí por una muda completa de la cutícula externa; durante este periodo de 4 días de duración se desarrollan los discos imaginales, que son estructuras de origen epitelial que crecen dentro de la larva y darán lugar a gran parte de la cutícula externa del organismo adulto (Fig. I-9). Esta fase finaliza con el comienzo de la pupación, la cutícula externa se endurece y oscurece para dar origen al pupario; dentro de éste se producen los fenómenos que comprenden la metamorfosis como son la histólisis mediante la cual los tejidos larvarios son reabsorbidos y sustituidos por los tejidos adultos. La fase pupal dura unos 5 días y desemboca en la eclosión del adulto (Lawrence, 1992).

Este trabajo se ha centrado principalmente en la fase embrionaria temprana de la mosca del vinagre.

Figura I-9. Los discos imaginales de *Drosophila melanogaster*.
Figura esquemática que representa los discos imaginales de la larva y los tejidos a los que dan origen en el adulto. Modificado de *The Interactive Fly*.



- Discos:**
- 1. Labial
 - 2. Clipeolabial
 - 3. Humeral
 - 4. Ojo-Antena
 - 5. Pata 1
 - 6. Pata 2
 - 7. Pata 3
 - 8. Ala
 - 9. Halterio
 - 10. Genital

I-4. Desarrollo embrionario temprano de *Drosophila melanogaster*

El desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* comienza en el citoplasma común del huevo después de la fusión de los pronúcleos masculino y femenino. A este hecho le suceden 13 divisiones que se producen de manera muy rápida, de 8 a 9 minutos de duración, y de forma casi sincronizada en el bastodermo sincitial. Las primeras divisiones ocurren en el centro del embrión. Durante el ciclo de división 8 la mayoría de los núcleos comienza a migrar hacia la periferia. Sobre el ciclo de división número 9 algunos núcleos situados en la zona posterior del embrión se diferencian como núcleos polares, y serán los progenitores potenciales de la línea germinal. Durante el ciclo de división 13 comienza la invaginación de la membrana plasmática que rodea a los núcleos y que termina al final del ciclo de división 14 dando lugar al blastodermo celular, en el que todos los núcleos se colocan en la periferia del embrión en forma de monocapa alrededor del citoplasma del huevo. Desde el ciclo de división 14 las

células ralentizan en gran medida sus divisiones que ya no se dan de manera sincronizada (Fig I-10).

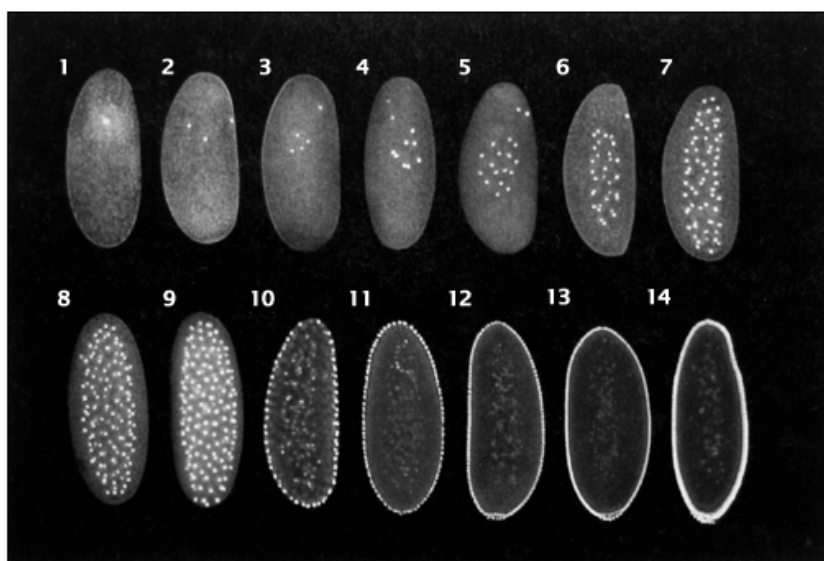


Fig. I-10. Desarrollo embrionario temprano de *Drosophila melanogaster*. Una vez fusionados los pronúcleos masculino y femenino en el embrión de *Drosophila* se suceden 13 divisiones bajo un citoplasma común. Las 9 primeras divisiones tienen lugar en el centro del huevo y los núcleos resultantes migran hacia la periferia del embrión para sufrir 4 divisiones más. Esta etapa del desarrollo embrionario se denomina blastodermo sincitial. A partir de aquí la membrana plasmática se empieza a invaginar produciéndose la celularización de los núcleos, fase que se conoce como blastodermo celular (Gilbert, 2003).

Antes de la formación del blastodermo celular los niveles de síntesis de ARN son muy bajos por lo que el embrión se vale de los ARN y las proteínas que le aporta la madre, lo que se conoce como componente materno (Foe y Alberts, 1983, Lawrence, 1992).

Una vez alcanzado el estadio de blastodermo celular empiezan a producirse los movimientos de gastrulación que originarán las tres capas embrionarias, endodermo, ectodermo y mesodermo que, mediante diferentes procesos morfogénéticos, generarán la gran diversidad de tejidos presentes en el animal.

Uno de los órganos que proceden del ectodermo son las glándulas salivares. Estas estructuras se diferencian pronto en el embrión a partir de dos placas de unas 100 células ectodérmicas cada una de ellas, cuyo número no variará más a lo largo del desarrollo si no que solamente aumentarían en volumen celular. Las glándulas salivares están compuestas por dos tipos de células: las células del ducto y las células secretoras. Las células del ducto generan un tubo simple que comunica las células secretoras con la cavidad bucal de la larva. Las células secretoras se encargan de generar una gran cantidad de proteínas que necesita la larva para digerir el alimento. Son células de estructura cúbica que endorreplan, es decir, replican una y otra vez su material genético sin que se produzca citocinesis. Este hecho provoca la formación de los cromosomas politénicos. Estos cromosomas de gran tamaño presentan un bandeo

característico de bandas e interbandas debido a la alternancia de zonas de cromatina más compacta o heterocromatina con zonas de cromatina más laxa o eucromatina. Estos patrones característicos unidos al gran tamaño de estos cromosomas han facilitado estudios de localización de genes, reordenaciones cromosómicas, deleciones, etc. (Andrew et al., 2000).

I-5. *eyegone* y *twin of eyegone*

eyegone (*eyg*) y *twin of eyegone* (*toe*) pertenecen a la familia de proteínas Pax. La familia Pax codifica para factores de transcripción muy conservados entre los metazoos que desempeñan gran variedad de funciones en procesos de desarrollo de vertebrados e invertebrados. En concreto, el gen *Pax6* se ha destacado como un gen selector en la morfogénesis del ojo en muchas especies bilaterales; debido a ello se cree que el ojo tiene un origen evolutivo monofilético (Gehring y Ikeo, 1999).

La expresión de los genes *Pax* comienza pronto en el desarrollo y es poco común que continúe una vez finalizada la organogénesis, aunque sí puede darse una re-expresión bajo ciertas circunstancias fisiológicas como la regeneración de tejidos (Wang et al., 2008). Las funciones tanto en tejido embrionario como adulto tienen que ver con mantener la plasticidad de células progenitoras, controlar la proliferación celular, la especificación de linaje, la migración y supervivencia celular, etc. (Mansouri et al., 1999).

En vertebrados existen 9 genes *Pax* (*Pax1-Pax9*) y todos ellos están asociados a múltiples cánceres (Maulbecker y Gruss, 1993, Robson et al., 2006). A menudo, se encuentra expresión alterada de estos genes en diferentes tipos de cáncer originados en tejidos que requerían de su expresión durante el desarrollo u homeostasis del tejido en cuestión. De alguna manera, en situaciones de cáncer la expresión de estos genes se encuentra desregulada. Algunos ejemplos son la expresión de *Pax2* en cáncer de ovarios, siendo importante para la supervivencia de las células cancerosas (Muratovska et al., 2003) o la sobreexpresión de *Pax6* que genera tumores pancreáticos en ratón (Yamaoka et al., 2000).

La familia génica *Pax* se caracteriza por la presencia del dominio de unión a ADN *Paired* (PD).

Este dominio se compone a su vez de dos subdominios capaces de unir ADN: *PAI* y *RED*. Además del dominio *PD* presentan un segundo dominio de unión a ADN denominado homeodominio de tipo *Paired* (HD). Casi todas las proteínas Pax descritas hasta el momento se unen al ADN a través de su subdominio *PAI*, que es suficiente y necesario para que se produzca la unión. La excepción a la regla la presentan la isoforma de vertebrados Pax6(5a) y *Eyg* y *Toe* cuyo subdominio *PAI* está truncado y se unen al ADN a través del subdominio *RED* (Fig. I-11) (Jun et al., 1998).



Fig. I-11. Dominios funcionales de genes de la familia Pax. Figura esquemática que representa los diferentes dominios de unión a ADN de los genes de la familia Pax: Pax6, Pax6(5a), *Eyg* y *Toe*. Estos genes presentan dos dominios de unión a ADN: el dominio *Paired* y el homeodominio de tipo *Paired*, el *Paired-Class Homeodomain* (HD). A su vez el dominio *Paired* se subdivide en los subdominios *PAI* y *RED*. *Eyg* y *Toe* al igual que la isoforma 5a de Pax 6 presentan el subdominio *PAI* truncado y se unen al ADN a través del subdominio *RED*.

Se han descrito varias funciones para *eyg* durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*. En todas ellas actúa como represor génico: se ha estudiado que *eyg* participa en el desarrollo del conducto de las glándulas salivares permitiendo que las células primordiales del conducto en el embrión formen el conducto individual de cada glándula y el conducto común en el que desembocan los dos individuales (Jones et al., 1998a). También se ha descrito una función para *eyg* durante el crecimiento del ojo de la mosca; mutantes para este gen carecen de un ojo completamente desarrollado o incluso éste no se llega a formar (Dominguez et al., 2004, Yao et al., 2008). Además, se sabe que *eyg* está implicado en la subdivisión del tórax de la mosca, ya que en su ausencia la región anterior del tórax no se constituye correctamente (Aldaz et al., 2003).

eyg y *toe* codifican para dos factores de transcripción que actúan como represores génicos (Yao y Sun, 2005, Yao et al., 2008). Estudios previos de nuestro laboratorio pusieron de manifiesto el mecanismo utilizado por *eyg* para reprimir uno de sus genes diana durante el

desarrollo del ojo: *wingless (wg)* (Salvany et al., 2012). *Eyg* se une al *enhancer* que dirige la expresión de *wg* en el disco imaginal de ojo-antena. Allí interacciona con la proteína HP1a, lo que provoca un aumento en el nivel de compactación de la cromatina que constituye esa región. En ausencia de *Eyg* esta región se abre permitiendo la consecuente desrepresión de *wg*. Además, pudimos comprobar que *Eyg*, al igual que HP1, se comporta como un supresor de la variegación y ambas proteínas interaccionan genéticamente para ello (Salvany et al., 2012).

eyg y *toe* están situados de manera adyacente en el brazo izquierdo del cromosoma III de *Drosophila*. Comparten un 60% de homología en su secuencia aminoacídica por lo que se piensa que son producto de una duplicación ancestral. Se ha visto que sus patrones de expresión prácticamente solapan a lo largo de todo el desarrollo. Esta expresión comienza en el estadio embrionario 9 y continúa durante el período larvario (Aldaz et al., 2003, Yao et al., 2008).

Se ha descrito que el aporte transcripcional de *eyg* es mayor que el de *toe* y que la falta de función de este último no genera fenotipo por sí misma aunque sí que lo hace cuando va acompañada de la reducción de una dosis de *eyg* (Yao et al., 2008). Sin embargo, la sobreexpresión de *Toe* produce un rescate parcial de la falta de *eyg* en el tórax de la mosca, lo cual sugiere que ambos conserven las mismas propiedades morfogenéticas (Aldaz et al., 2003). En cualquier caso, se piensa que ambos genes juegan papeles redundantes siendo *eyg* el que lleva el peso mayor de los dos, de ahí que no se le haya otorgado una función específica a *toe* hasta la fecha.

O**bj**etivos

1. Estudio de la función epigenética de *eyg* y *toe* durante el desarrollo embrionario temprano de *Drosophila melanogaster*.
2. Análisis de la posible función *toe* independiente de *eyg* durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*.

Materiales y métodos

M-1. Estirpes de *Drosophila melanogaster* utilizadas

Utilizamos la cepa *yw* como cepa silvestre.

Los alelos mutantes nulos para *eyg* que usamos fueron *eyg*^{20MD1} (Dominguez et al., 2004) y *eyg*^{SA2} desarrollado en nuestro laboratorio por S. Aldaz (Aldaz et al., 2003).

La doble mutación para *eyg* y *toe*, *FD2*, fue generada mediante el sistema Exelixis (Parks et al., 2004). La región genómica entre ambos genes fue eliminada gracias a la recombinación de las secuencias FRT (*Flipase Recombination Target*) de los elementos P: *PBac-f00412*, que se localiza 3' de *toe* y *P(XP)-d01629*, que está a 5' de *eyg*. La recombinación de las FRTs fue catalizada por la Flipasa, que está bajo el control de un promotor dependiente de temperatura (*heat shock*). Una vez enfrentados los dos cromosomas homólogos que contienen ambas inserciones dimos un golpe de calor a 37°C a la progenie de manera que se activara la expresión de la FLP e hiciera así recombinar ambas FRT. Los posibles machos recombinantes fueron seleccionados por la presencia de dos dosis de gen *white* (*w*) que proporciona color rojo al ojo y a continuación fueron sometidos a un test de complementación cruzándolos con

hembras mutantes para *eyg*. De esta manera elegimos aquellas moscas que no sobrevivían con la mutación de *eyg* y la doble mutación *FD2* en cromosomas homólogos.

Para generar los clones de recombinación mitótica utilizamos las estirpes:

- *y,w, hs-FLP; ubi-GFP, FRT^{2A} / TM6b* (para los clones en fondo *eyg^{SA2}/+* y *FD2/+*)
- *y,w, hs-FLP; M(3L)67C, ubi-GFP, FRT^{2A} / TM3* (para los clones en fondo *M/+*)
- *eyg^{20MD1}, FRT^{2A} / TM6b* (Dominguez et al., 2004)
- *eyg^{SA2}, FRT^{2A} / TM6b* (Aldaz et al., 2003)
- *FD2, FRT^{2A} / TM6b*

Para realizar los clones de la línea germinal se utilizaron las estirpes:

- *ovo-FLP; eyg^{20MD1}, FTR^{2A} / TM6b*
- *ovo^{D1}, FRT^{2A} / TM3* (Chou et al., 1993)

Para eliminar el componente materno con el sistema Maternal Gal4/UAS-ARN interferente se utilizaron las estirpes:

- *MTD-Gal4* (Petrella et al., 2007)
- *ARN-sh eyg* (Bloominton Stock Center)
- *ARN-sh toe* (Bloominton Stock Center)
- *ARN-sh twi* (Bloominton Stock Center)

M-2. Clones de recombinación mitótica “*en trans*”

Estos clones de células se realizaron mediante el sistema Flipasa/FTR procedente de levaduras (Xu y Rubin, 1993). Se disponen secuencias FRT en la misma posición de cromosomas

homólogos que recombinan entre sí gracias a la flipasa. Una vez enfrentados los dos cromosomas homólogos que contienen los FRT dimos un golpe de calor a 37°C a la progenie de manera que se activara la expresión de la FLP e hiciera así recombinar ambas FRT (Fig. M-1). Los clones fueron generados 72 horas antes de la pupación aplicando el golpe de calor durante 20 minutos.

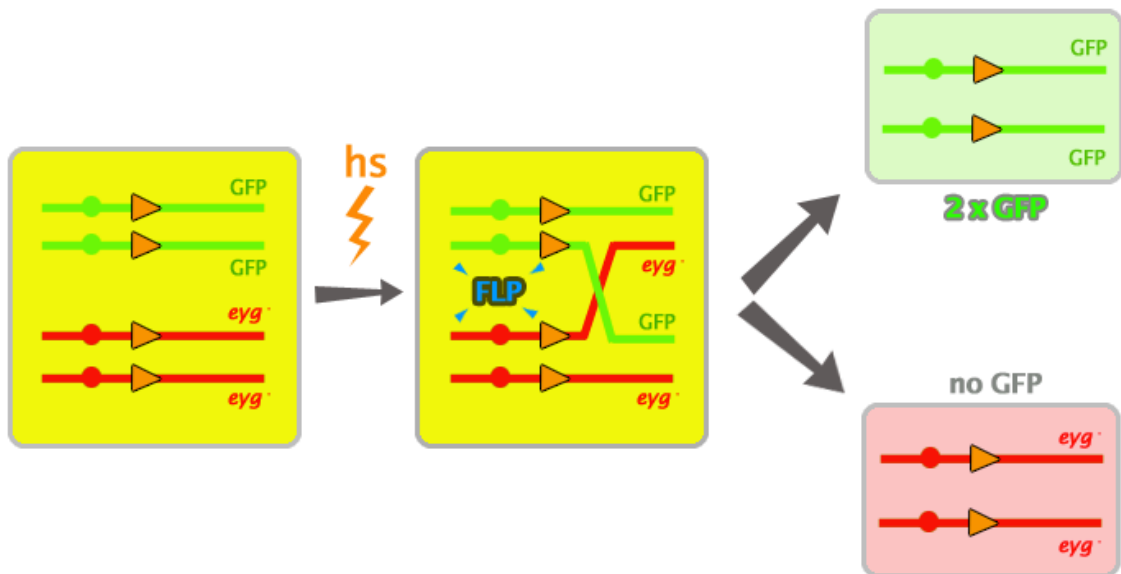


Figura M-1. Generación de clones de recombinación mitótica. Figura esquemática que representa el sistema flipasa/FRT para realizar clones de recombinación mitótica. La recombinación de las secuencias FRT permite que en la segregación mitótica las células hijas hereden de manera homocigótica la mutación correspondiente (*eyg*⁻) (célula roja) y el marcador *ubi-GFP* (célula verde). La recombinación se produce gracias a la expresión de la flipasa (FLP) que está controlada por un promotor de *heat shock* (hs).

M-3. Generación de clones de la línea germinal

Con el fin de eliminar el componente materno de *eyg* recurrimos al sistema de generación de clones de la línea germinal ideado por Chou y Perrimon (Chou y Perrimon, 1996). Este sistema se basa en el precedente de levaduras FRT/Flipasa (FRT/FLP) (Xu y Rubin, 1993) y tiene varios componentes: por una parte un alelo dominante del gen *ovo*, el *ovo*^{D1} que impide el desarrollo normal del huevo, por lo que su presencia en heterocigosis provoca que éste no llegue a formarse; por otra parte está la mutación de interés, en nuestro caso *eyg*^{20MD1} y por último las

secuencias FRT, que recombinan entre sí en presencia de Flipasa (FLP) (Fig. M-2). Sólo aquellos huevos resultantes de la recombinación de las FRT y que lleven en homocigosis la mutación de interés se desarrollarán y todos ellos habrán perdido el componente materno del gen en cuestión.

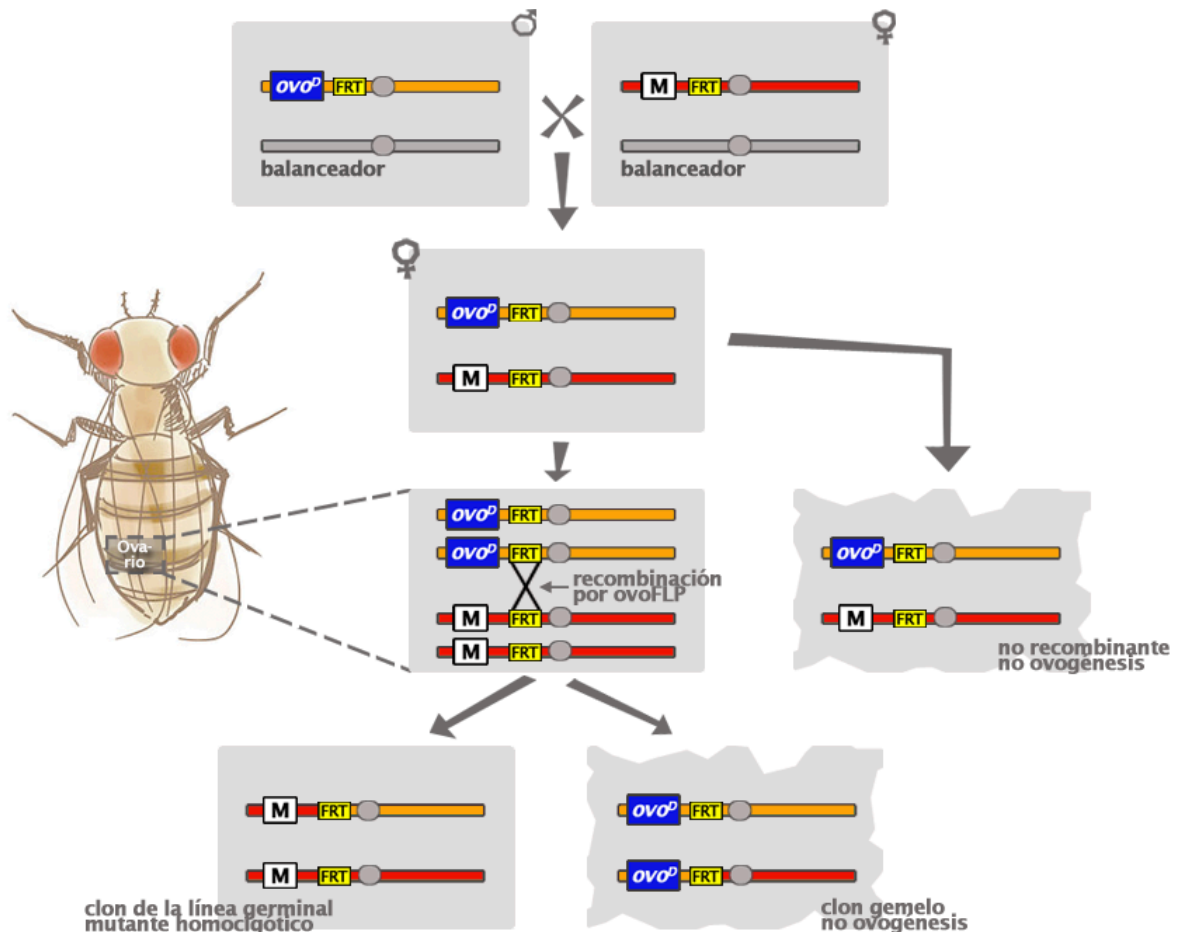


Figura M-2: Generación de clones de la línea germinal. Representación esquemática del sistema desarrollado por Chou y Perrimon (Chou y Perrimon, 1996) que permite eliminar el componente materno de un gen de interés. El proceso es el siguiente: se cruzan machos con el alelo dominante ovo^{D1} (ovo^D), que no permite el desarrollo del huevo, recombinado FRT con hembras vírgenes que porten la mutación (M) recombinada con un FRT y el aporte de la FLP dirigida por el promotor *ovo*. Se seleccionan hembras vírgenes de la F1 descartando los cromosomas balanceadores. Gracias a la *ovoFLP*, en la línea germinal de estas hembras se producirá la recombinación de las secuencias FRT dando lugar a dos células recombinantes: una de ellas llevará el alelo ovo^{D1} en homocigosis que no permitirá el desarrollo del huevo (clon gemelo) mientras que la otra célula llevará la mutación en homocigosis (clon de la línea germinal) y se desarrollará en ausencia del gen de interés. En el caso probable de que no se de recombinación (no recombinante) esta célula no se desarrollará debido a la presencia de la mutación dominante ovo^{D1} .

En nuestro caso, el proceso fue el siguiente: cruzamos machos $ovo^{D1}, FRT^{2A}/TM3$ (Chou et al., 1993) con hembras vírgenes $ovo-FLP; eyg^{20MD1}, FTR^{2A}/TM6b$. El gen *ovo-FLP* del cromosoma X permite que se exprese la FLP bajo el control del promotor del gen *ovo*, únicamente en la zona germinal. A continuación, de la F1 seleccionamos hembras $ovo-FLP; eyg^{20MD1}, FTR^{2A}/ovo^{D1}$,

FRT^{2A} que son cruzadas con machos $FD2 / TM3$, $twi-GFP$. Los embriones puestos en este cruce fueron los utilizados para ejecutar los experimentos.

M-4. Sistema Gal4/UAS

Este sistema permite expresar un gen de interés en lugar y tiempo determinados (Brand y Perrimon, 1993). Se vale de dos componentes: por una parte el trans-activador Gal4, cuya expresión está dirigida por promotores o *enhancers* génicos y por otra parte las secuencias activadoras UAS unidas a un gen efector. Estas secuencias son reconocidas por las proteínas Gal4 que se unen a ellas; esta unión desencadena la activación del gen efector que reproduce la expresión espacio-temporal del promotor o *enhancer* en cuestión (Fig. M-3).

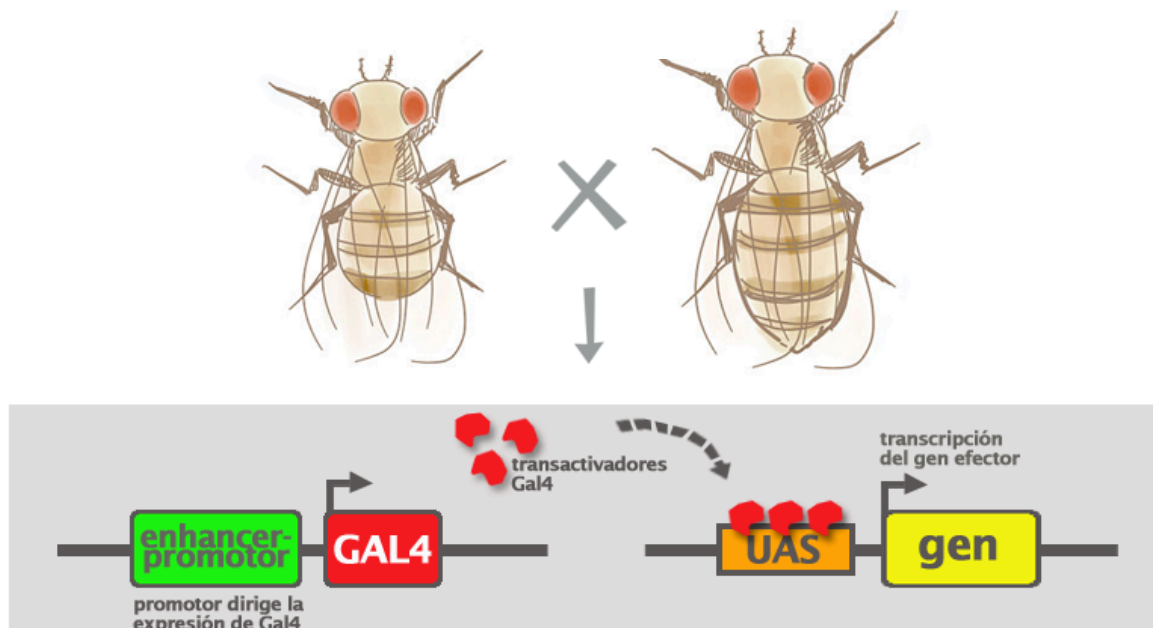


Figura M-3: Sistema Gal4/UAS. Representación esquemática del sistema Gal4/UAS. Mediante este sistema desarrollado por Brand y Perrimon (Brand y Perrimon, 1993) se consigue sobre-expresar un gen en un lugar y momento controlados. El proceso es el siguiente: se cruzan dos moscas, de las cuales una de ellas llevará el trans-activador Gal4 cuya expresión está dirigida por un enhancer o promotor génico y la otra portará la secuencia activadora UAS seguida del gen que se quiere sobre-expresar. Gal4 se transcribe en el momento y lugar donde lo hace el promotor o enhancer, sus proteínas reconocen la secuencia UAS, se unen a ella y provocan la transcripción del gen clonado tras dichas secuencias.

M-5. Sistema Maternal Gal4/UAS-ARN interferente

Este sistema se basa en el mencionado Gal4/UAS para eliminar el componente materno de un gen de interés (Staller et al., 2013). En este caso, el Gal4 está dirigido por promotores o *enhancers* que se expresan durante el desarrollo de la línea germinal de las hembras. Las proteínas Gal4 se unen a las secuencias UAS y activan la expresión de un ARN interferente de tipo *short hairpin* (ARN-sh) contra un gen de interés cuyo ARN mensajero se ve degradado. Los ARN-sh son efectivos durante la ovogénesis por lo que este sistema se presenta como una alternativa a los clones de la línea germinal.

En nuestro caso utilizamos el promotor *maternal triple driver-Gal4* (MTD-Gal4) (Petrella et al., 2007). Se trata de un promotor triple formado por: *P(otu-Gal4::VP16.R)1, w[*]* en el cromosoma X; *P(Gal4-nos.NGT)40* en el cromosoma II; y *P(Gal4::VP16-nos.UTR)CG6325[MVD1]* en el cromosoma III. *P(otu-Gal4::VP16.R)* contiene el promotor de *ovarian tumor (otu)* y la región 3'-UTR de *fs(1)K10* que dirige una fuerte expresión durante el estadio 1 de la cámara del huevo. *P(Gal4-nos.NGT)* presenta el promotor de *nanos (nos)* y su región 3'-UTR que dirigen la expresión en todo el germario. Y por último *P(Gal4::VP16-nos.UTR)* que contiene el promotor de *nos* y la región 3'-UTR de *αTubulin84E* que conduce la expresión durante la ovogénesis.

Para llevar a cabo este experimento cruzamos hembras vírgenes homocigóticas *MTD-Gal4* con machos homocigóticos que contienen el ARN-sh de los genes *eyg*, *toe* y *twist (twi)* unidos a la secuencia UAS. Las hembras de la F1 *MTD-Gal4 / ARN-sh* las cruzamos con machos *armadillo-Gal4* para prolongar el efecto en el tiempo del ARN interferente ya que este gen se expresa de manera ubicua durante el desarrollo embrionario. Y fueron los embriones puestos en este cruce los sometidos a análisis.

Este sistema presenta la ventaja de que al final del proceso se obtiene un número de embriones mucho mayor que con los clones de la línea germinal ya que estos últimos proceden del resultado de una recombinación previa. Por esta razón elegimos el sistema Maternal-Gal4/UAS-ARN-sh para trabajar en experimentos de biología molecular.

M-6. Generación del anticuerpo α -Toe

Este anticuerpo fue generado por la empresa Biomedal ProPure contra tres secuencias aminoacídicas de la proteína Toe que no están presentes en Eyg y que son susceptibles de ser modificadas postraduccionalmente por fosforilación. Estas secuencias fueron:

- CKQRDSPSTSS
- CPESGQQKQPYPYST
- CQAQSGRDHQSEEREYEDE

El software utilizado para elegir las secuencias fue el facilitado por <http://prosite.expasy.org/>. El anticuerpo se generó pinchando en dos conejos una mezcla de las tres secuencias arriba descritas cada 10 días. En total se realizaron 4 pinchazos tras los cuales se sacrificaron los conejos y se les extrajo la sangre para purificar el anticuerpo.

M-7. Fijación de ovariolas de hembras adultas y glándulas salivares larvarias de tercer estadio

Disecionamos los organismos en PBS por un tiempo máximo de 20 minutos. Fijamos con paraformaldehído al 4% con detergentes DOC y Tritón X-100 al 0,1% durante 45 minutos. Paramos la fijación lavando con PBS durante 2 minutos y a continuación realizamos 2 lavados de 20 minutos con solución de lavado (PBS, Tritón X-100 0,03% y BSA, albúmina de suero bovino, al 1%). A partir de aquí estos tejidos son tratados de distintas formas.

Incubamos las glándulas salivares con Faloidina (1:500, Invitrogen) y TO-PRO3 (de aquí en adelante topro, 1:500, Invitrogen) en solución de lavado durante 2 horas. Las lavamos varias veces con solución de lavado y las montamos en medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories).

Las ovariolas fueron incubadas con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C y lavadas durante 1 hora en solución de lavado. A continuación se incubaron con anticuerpos secundarios durante 2 horas en oscuridad. Después se lavaron varias veces y se montaron en Vectashiel (Vector Laboratories).

Los anticuerpos utilizados para la tinción de ovariolas fueron:

- α -Eyg/Toe generado en cobaya (1:100) por S. Aldaz en nuestro laboratorio (Aldaz et al., 2003).
- α -Toe generado en conejo (1:100) (Biomedal)
- Los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos (1:200) proceden de Alexa Molecular Probes.

M-8. Obtención de cutículas embrionarias

Recogimos puestas de embriones de 18 horas, les quitamos el corion exponiéndolos a lejía comercial durante 2 minutos; los restos de lejía fueron lavados con agua. A continuación, eliminamos la membrana vitelina agitando con fuerza los embriones en una solución heptano-metanol 1:1. Después los lavamos con metanol para ser montados en ácido láctico:Hoyer's, que disgrega las partes blandas y los incubamos durante la noche a 65°C. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio óptico Zeiss Axiophot y procesadas con el software Adobe Photoshop.

M-9. Análisis *in vivo* de divisiones del blastodermo sincitial

Realizamos puestas de 2 horas de moscas de genotipo *his2-RFP; FD2/TM6b*. Recogimos los embriones, eliminamos el corion con lejía durante 2 minutos y los lavamos con abundante agua. Seleccionamos aquellos en estadio de blastodermo sincitial en una lupa de fluorescencia. A continuación, los pegamos a un cubreobjetos con solución adherente (resultado de incubar papel de celo con heptano durante 4-10 horas) y los visualizamos en un microscopio confocal invertido (LSM510 de Zeiss). Las imágenes fueron tomadas cada 50 segundos y procesadas con el software Fiji/Image J.

M-10. Tinción inmunohistoquímica de embriones

Recogemos embriones de puestas de una duración determinada y eliminamos su corion exponiéndolos a lejía comercial durante 2 minutos, que posteriormente lavamos con abundante agua. A continuación, los fijamos en una solución de formaldehído al 5% y heptano durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación. Quitamos la fase acuosa y añadimos metanol. Eliminamos la membrana vitelina agitando vigorosamente y lavamos los embriones con metanol varias veces hasta un tiempo total de 15 minutos. Después los rehidratamos con una solución de metanol y PBS-Tween 0,1% 1:1 y otra de PBS-Tween 0,1% durante 15 minutos cada una y los bloqueamos con BSA al 10% (Sigma) durante 30 minutos. Incubamos el anticuerpo primario durante la noche a 4°C y lo lavamos 1 hora con PBS-tween 0,1%. El anticuerpo secundario lo incubamos durante 2,5 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente lavamos los embriones durante 30 minutos con PBS-tween 0,1% y los incubamos, si es el caso, con topopro 15 minutos; seguidamente los lavamos 30 minutos más con PBS-tween 0,1% y los montamos en Vectashield.

Los anticuerpos utilizados fueron:

- α -Eyg/Toe.
- α -Toe.
- α - γ -Tub generado en ratón (1:1000) de Sigma.
- α -Ph3 generado en conejo (1:100) de Cell Signalling Technology.
- α -His2Av-P generado en conejo (1:400) de Rockland.
- α -CID generado en conejo (1:100) cedido por Azorin.
- α - β gal generado en conejo (1:2000) de Cappel ICN Biomedicals.
- Los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos (1:200) proceden de Alexa Molecular Probes.

Utilizamos Faloidina 555 (1:200) de Invitrogen para observar las membranas plasmáticas ya que marca la F-actina. Ésta fue incubada junto a los anticuerpos secundarios. El ADN fue marcado con topro (1:500).

Adquirimos las imágenes en un microscopio confocal Leica TCS SPE y las editamos con el software Adobe Photoshop.

M-11. Hibridación *in situ* fluorescente con tinción inmunohistoquímica de embriones

Tras la decorionación de los embriones con lejía comercial, éstos fueron fijados en una solución de formaldehído al 5% y heptano durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación. Quitamos la fase acuosa y añadimos metanol. Eliminamos la membrana vitelina agitando vigorosamente y lavamos los embriones con metanol varias veces hasta un tiempo total de 15 minutos. Después los rehidratamos con una solución de metanol y PBS-Tween 0,1% 1:1 y otra de PBS-Tween 0,1% durante 15 minutos cada una. A continuación, volvimos a fijar los embriones con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS-Tween 0,1% y los lavamos con PBS-Tween 0,1%. Después incubamos los embriones una hora con solución de hibridación

(formamida 50%, 5 x SSC (1 x SCC es NaCl 150mM y citrato de sodio 15 mM) 50 mg/ml de heparina, 0,1% Tween 20 y 40 mg/ml tRNA) a 55°C. Desnaturalizamos la sonda a 80°C durante 5 minutos y la hibridamos con los embriones toda la noche a 55°C. Lavamos los embriones una vez con solución de hibridación a 55°C, otra vez con PBS-Tween 0,1% y solución de hibridación 1:1 a 55°C y 4 veces más con PBS-Tween 0,1% a temperatura ambiente. Después incubamos los embriones una hora con el anticuerpo α -Dioxigenina de oveja (1:200) (Roche), los lavamos 4 veces con PBS-Tween 0,1% y los incubamos una hora con un anticuerpo biotinilado de oveja (1:200) (Jackson ImmunoResearch Laboratories). A continuación lavamos los embriones 4 veces con PBS-Tween 0,1% y los incubamos 20 minutos con el AB complex (1:100 Vector Laboratories), los lavamos tres veces con PBS-Tween 0,1% y los incubamos 20 minutos con tiramida (1:50) (PerkinElmer) en oscuridad. Los siguientes pasos fueron en oscuridad. Lavamos varias veces con PBS-Tween 0,1% e incubamos durante la noche los embriones con el anticuerpo primario a 4°C. Después de tres lavados con PBS-Tween 0,1% incubamos los embriones con el anticuerpo secundario 2,5 horas a temperatura ambiente. Los lavamos 3 veces más en PBS-Tween 0,1% y los montamos en Vectashield (Vector Laboratories).

Las sondas antisentido de ARN contra los mensajeros de *eyg* y *toe* (Aldaz et al., 2003) se usaron 1:20. Los anticuerpos utilizados fueron: α -GFP generado en conejo (1:200) (Promega) y el anticuerpo secundario Alexa 555 generado en conejo (1:200) (Alexa Molecular Probes).

M-12. Tinción inmunohistoquímica de cromosomas politénicos

Los cromosomas politénicos fueron obtenidos siguiendo el protocolo (Stephens et al., 2004). Los anticuerpos utilizados fueron: anticuerpo primario α -Eyg/Toe de cobaya (1:100) (Aldaz et al., 2003) y anticuerpo secundario Alexa 555 desarrollado en cobaya (1:200) (Alexa Molecular Probes). El ADN se marcó con topopro (1:500).

M-13. Tinción de cromosomas mitóticos

Seleccionamos larvas de tercer estadio de genotipo *yw* y *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1}. Extrajimos su sistema nervioso central (SNC) en solución salina (NaCl 0,7%). Colocamos el SNC en citrato sódico 0,5% para producir un choque hipotónico durante 10 minutos. A continuación, fijamos el SNC en ácido acético, metanol y agua en proporción 11:11:12 durante 15 segundos. Situamos el SNC en un portaobjetos siliconado con 15 µl de ácido acético al 45%. Colocamos un cubreobjetos sobre la muestra y realizamos el *squash* o aplastado con el dedo pulgar ayudándonos de papel de filtro sobre el cubreobjetos. Después, congelamos la muestra en nitrógeno líquido y retiramos rápidamente el cubreobjetos con una cuchilla. Incubamos el portaobjetos 10 minutos en etanol absoluto y lo secamos al aire. Una vez seco, teñimos el SNC con topro durante 15 minutos y lavamos con PBT varias veces durante 45 minutos. Utilizamos Vectashield como medio de montaje.

Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal invertido (LSM510 de Zeiss) y procesadas mediante el sistema de deconvolución con el software Fiji/Image J por el personal del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

M-14. Western Blot de embriones

Recogimos embriones de puestas de 1,5 horas de duración, los decorionamos con lejía comercial durante 2 minutos, lavamos el exceso de lejía y los homogeneizamos en solución de lisis (Tris pH 8.0 50 mM, NaCl 150 µM, tritón X-100 1%, SDS 0,5% y EDTA 1 µM) con inhibidor de proteasas (Roche) en hielo. Cuantificamos la concentración de proteína con el ensayo Bradford (Bradford, 1976). Corrimos 50 µg de cada muestra en un gel SDS-PAGE (acrilamida al 10%) y las transferimos a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences). A continuación incubamos la membrana con solución de bloqueo (leche desnatada 5% p/v) durante 30 minutos y el anticuerpo primario toda la noche en solución de bloqueo a 4°C. Lavamos la

membrana con TBS-T (Tris-HCl pH 8.0 20 mM, NaCl 150 mM y 0,2% Tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después incubamos la membrana con el anticuerpo secundario fluorescente (Li-Cor Biosciences) 2 horas en oscuridad. Lavamos la membrana con TBS-T en oscuridad durante una hora.

Los anticuerpos primarios utilizados son: α -Eyg de cobaya (1:100) (Aldaz et al., 2003), α -Toe de conejo (1:100), IRDye 680 de cobaya (1:10000) (Li-Cor Bioscience), IRDye 680 de conejo (1:10000) (Li-Cor Bioscience). Como control de carga se utilizaron bandas inespecíficas de cada carril.

Por último visualizamos la membrana con *Odissey Infrared Imaging System*. Las imágenes obtenidas fueron editadas con el software Adobe Photoshop.

M-15. Extracción de ADN genómico

Homogeneizamos de 8 a 10 larvas de tercer estadio en 100 μ l de solución de lisis (Tris-HCl pH 9.0 0,1M, EDTA 1M y SDS 1%). El homogeneizado lo incubamos durante 30 minutos a 70°C y se añadieron 14 μ l de KAc 8M; después de 30 minutos en hielo centrifugamos a 4°C (15000 r.p.m., 15 minutos) y nos quedamos con el sobrenadante. Añadimos 0,5 volúmenes de isopropanol para precipitar el ADN y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación añadimos fenol-cloroformo para limpiar el ADN. Se llevó la muestra a 10% de NaAc 3M y para precipitar el ADN se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto. Después de 20 minutos a -20°C centrifugamos la muestra y la lavamos con etanol al 70%. Después de una centrifugación el pellet fue resuspendido en TE (10mM Tris-HCl pH 8; 1mM EDTA) y medimos la concentración del ADN en un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

M-16. Ensayo de PCR

Para el ensayo de PCR utilizamos el kit *Expand High Fidelity System* (Roche). Y las parejas de oligonucleótidos usados fueron:

1-FW: 5'-GCGATGGATCCCCTCCACATCC-3'; **1-RV:** 5'-GCAACCAGCACATGGAAGAGCC-3';

2-FW: 5'-CGCCATTTGCTCGTCTGTTGG-3'; **2-RV:** 5'-CCCACAGCAATGGCCACAATACC-3';

3-FW: 5'-TCGATCTTGGAGACGACAGTCGG-3'; **3-RV:** 5'-GCAGCCAGTCAACAGGTAGCAGG-3';

4-FW: 5'-GTGAGAGGCGTGTCTGAAGAGC-3'; **4-RV:** 5'-CAACTGCAAGTTGACTCCAGTCG-3';

5-FW: 5'-GCCGATGGACAGCTGAAGATGC-3'; **5-RV:** 5'-CCAGATTCCAACATCCCATTGCG-3';

6-FW: 5'-GCTTGCCATGATCGCTATCTTCC-3'; **6-RV:** 5'-CGGAGAGTGAAGACTGAGGAGC-3';

7-FW: 5'-GGTGCAGAGGATGATGGTGATGG-3'; **7-RV:** 5'-GGTAGTGTTGTTGGTGCGTGC-3';

Actina-FW: 5'-CACGGTATCGTGACCAACTG-3'; **Actina-RV:** 5'-GCCATCTCCTGCTCAAAGTC-3'.

M-17. RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Hicimos la extracción de ARN total con el kit *GE Illustra RNAspin Mini* (GE Healthcare). Medimos la concentración de ARN obtenida en un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). A continuación, retrotranscribimos 1 µg de ARN total por cada muestra por RT-PCR con el kit *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* (Roche).

La PCR cuantitativa se llevó a cabo con el kit *Lightcycler FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I* (Roche). En cada muestra de volumen final 20 µl se cargaron 2 µl de ADN complementario obtenido de la RT-PCR.

Las parejas de oligonucleótidos utilizadas fueron:

Actina-FW: 5'-CACGGTATCGTGACCAACTG-3'; **Actina-RV:** 5'-GCCATCTCCTGCTCAAAGTC-3';

260-FW: 5'-TGGAAATTTAATTACGAGCT-3'; **260-RV:** 5'-ATGAACTGTGTTCAACAAT-3';

359-FW: 5'-GTTTTGAGCAGCTAATTACC-3'; **359-RV:** 5'-TATTCTTACATCTATGTGACC-3';

361-FW: 5'-TGAGCTCGTAATAAAATTCC-3'; **361-RV:** 5'-TCAACGATGTATGACATTCC-3';

H23-FW: 5'-CCAAGTTGGCCAGTTTTGAT-3'; **H23-RV:** 5'-AGTTCAAGCCCGGGTATTCT-3';

Het-A-FW: 5'-TTGTCTTCTCCTCCGTCCACC-3'; **HeT-A-RV:** 5'-GAGCTGAGATTTTCTCTATGCTACTG-3';

TAS-FW: 5'-TTGTAATTTGGTGCGGCAGC-3'; **TAS-RV:** 5'-CAGCGTGACTGTTCGCATTC-3';

EygEsp-FW: 5'-AGCGGGATCGGGAGCGGTAGC-3'; **EygEsp-RV:** 5'-GGCCACCTTGGGCTTTGAGCC-3'

ToeEsp-FW: 5'-GGTGGCCACTGCCTCACCCAC-3'; **ToeEsp-RV:** 5'-CGCTCCTCCGACTGATGATCC-3'

Realizamos la cuantificación relativa mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Los datos obtenidos fueron normalizados en base a la expresión del gen de la actina. Este gen mantiene estables y constantes sus niveles de expresión en todos los experimentos realizados durante este trabajo. El software utilizado para realizar los cálculos de cuantificación fue Microsoft Excel.

R Resultados

R-1. Generación de la cepa doble mutante para *eyg* y *toe*: *FD2*

R-1.1 Estrategia

Con el fin de averiguar si *toe* tiene un papel por sí mismo o si el papel de *eyg* y *toe* es redundante durante el desarrollo, decidimos generar una cepa que eliminara los dos genes; de esta forma podemos comparar los fenotipos de mutantes para *eyg* frente a esta doble mutación e inferir así el posible papel de *toe*.

Para ello recurrimos a la técnica de generación de deficiencias mediante recombinación descrita por Exelixis (Parks et al., 2004) que permite generar deleciones en cualquier cromosoma de *Drosophila*. Dichas deleciones se producen gracias a la recombinación de las secuencias FRT (*Flipase Recombination Target*) de dos transposones insertados en los extremos de la región que se quiere eliminar. Estas regiones son capaces de recombinar en presencia de una recombinasa denominada Flipasa; de esta forma se escinde la zona de interés.

Con este fin utilizamos dos transposones insertados flanqueando a *toe* y *eyg* en el cromosoma. Estos transposones fueron PBac f00412 que se localiza 3' de *toe* y P(XP)d01629 que está a 5' de *eyg* (Fig. R-1).

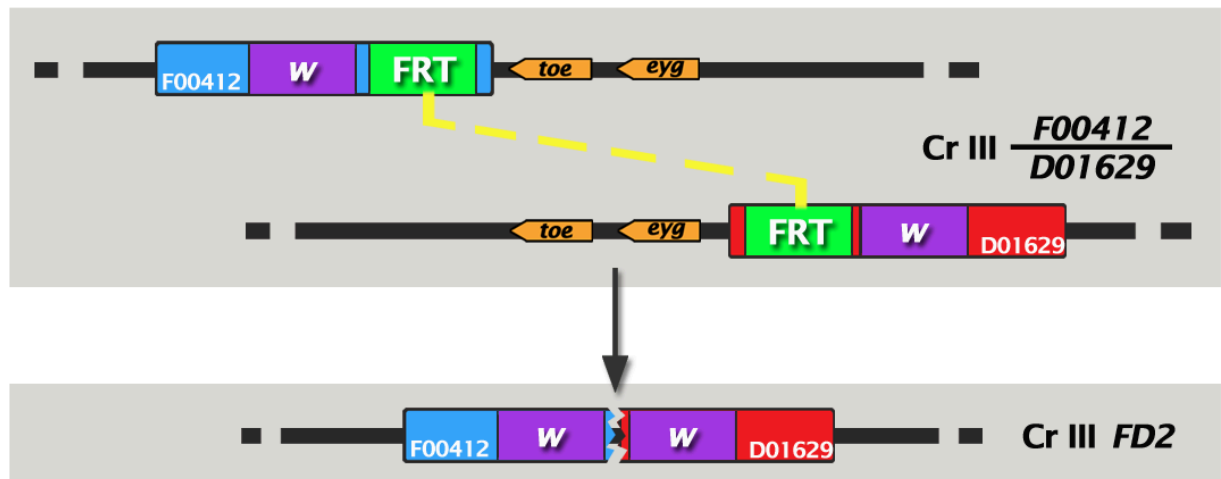


Figura R-1. Estrategia de la generación del doble mutante *FD2*. Representación esquemática de los transposones PBac f00412 y P(XP)d01629 utilizados para generar la doble deficiencia *FD2*. Ambos flanquean a *toe* y *eyg* y gracias a la recombinación de sus secuencias FRT se eliminó la región cromosómica que alberga ambos genes. Ambos transposones llevan un gen *white* (*w*). El elemento P híbrido que resulta de la recombinación portará dos dosis de *w* que permiten seguir si la recombinación se ha producido correctamente.

Una vez realizada la recombinación, procedimos a analizar si la delección de ambos genes, que denominamos *FD2*, se había producido correctamente. Para ello realizamos diferentes abordajes: por una parte realizamos análisis inmunohistoquímicos y por otra parte análisis moleculares.

R-1.1 Análisis

R-1.1.A Análisis inmunohistoquímico

El primer abordaje consistió en un análisis inmunohistoquímico: teñimos embriones ya segmentados con el anticuerpo α -Eyg/Toe. Este anticuerpo reconoce las dos proteínas ya que, aunque haya sido generado contra el ADN complementario de *eyg* ambos genes presentan una alta homología de secuencia y es de suponer que reconozca epítomos de las dos proteínas.

Como se aprecia en la figura R-2, los embriones homocigóticos para la doble mutación (*FD2/FD2*) (Fig. R-2 b) ven drásticamente reducidos los niveles de proteína en comparación con los heterocigóticos *FD2/abdA-lacZ* (Fig. R-2 a).

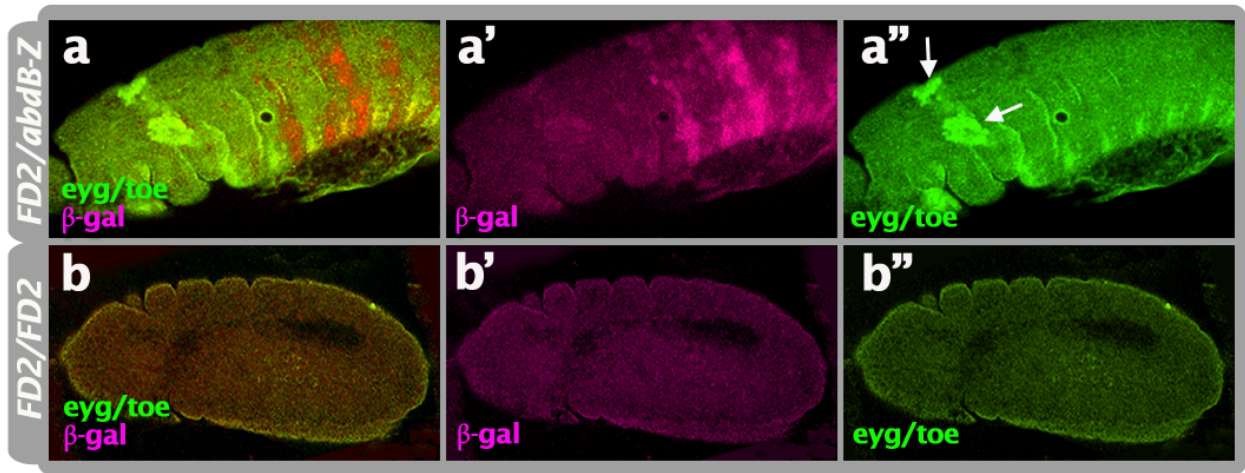


Figura R-2. Análisis inmunohistoquímico. Tinción inmunohistoquímica con α -Eyg/Toe de embriones segmentados. En los embriones homocigóticos *FD2/FD2* los niveles de proteína Eyg y Toe (en verde) se ven drásticamente reducidos (b'') en comparación con los heterocigotos *FD2/abdA-Z* (a'') donde se observa una señal segmental y otra señal en los discos imaginales de ojo-antena (flechas).

Ya que este anticuerpo reconoce ambas proteínas quisimos validar que realmente ambos genes habían sido eliminados mediante una hibridación *in situ* fluorescente con sondas que reconocen específicamente los ARNs mensajeros de cada gen. De nuevo, en los embriones homocigóticos para la doble mutación (*FD2/FD2*) los niveles de ARN de ambos genes se redujeron respecto a los heterocigóticos (*FD2/twi-GFP*) (Fig. R-3 (b', d' y a', c', respectivamente)). Esta reducción, aún siendo muy considerable, no parece ser total, sobre todo en el caso de *toe*, en el que se observa una señal basal de fondo (véase discusión).

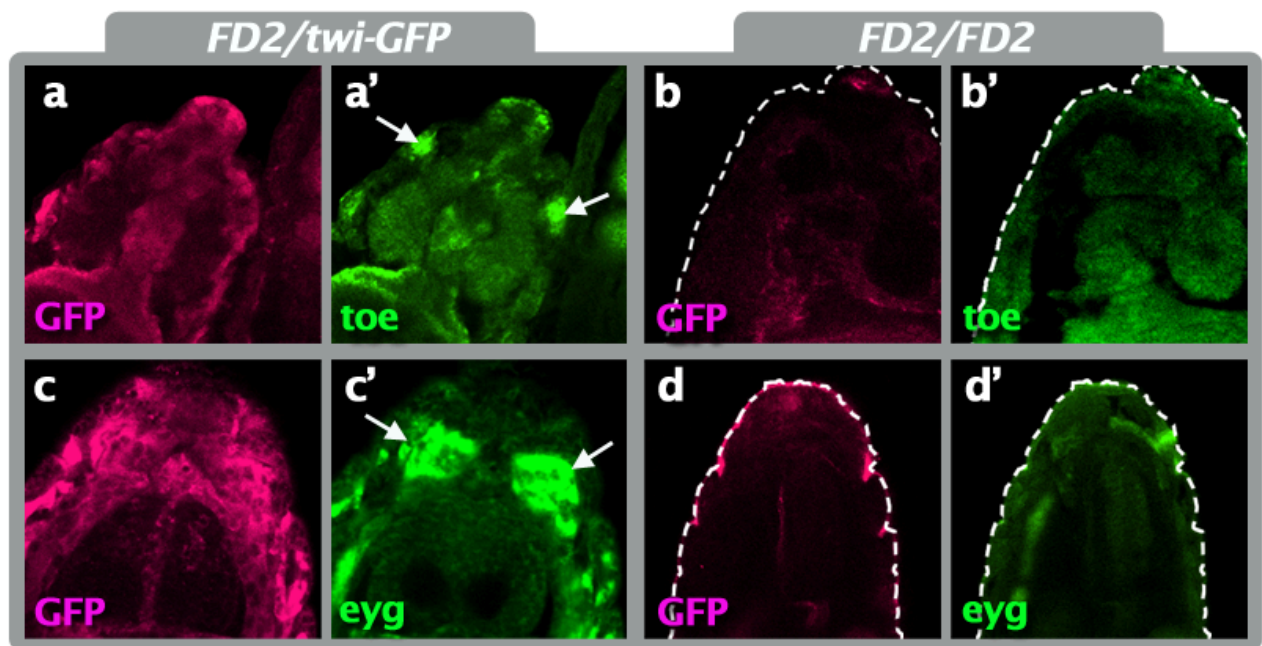


Figura R-3. Análisis inmunohistoquímico. Hibridación *in situ* con sondas específicas contra el ARN de *toe* y de *eyg* de embriones segmentados. En embriones heterocigóticos *FD2/twi-GFP* se observa señal (en verde) de los transcritos de *toe* (a') y *eyg* (c') en los discos imaginales de ojo-antena (flechas) mientras que en los homocigóticos *FD2/FD2* la señal específica de ambos desaparece (b' y d', respectivamente).

R-1.1.B Análisis molecular

El siguiente abordaje fue el molecular, que dividimos en dos partes: por una parte diseñamos 7 parejas de cebadores que amplifican siete regiones genómicas presentes entre ambos genes, incluidas las codificantes para *eyg* y *toe* (Fig. R-4 a). Por medio de PCR se amplificaron estas regiones utilizando ADN genómico extraído de larvas silvestres y doble mutantes homocigóticas (*FD2/FD2*). No obtuvimos amplificación en las PCRs realizadas con el ADN de *FD2/FD2* mientras que el resultado fue positivo en las realizadas con el ADN extraído de larvas silvestres (Fig. R-4 b).

Además quisimos averiguar si los niveles de transcritos sintetizados de ambos genes se estaban viendo afectados en esta nueva cepa mutante. Para ello realizamos experimentos de RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) a partir de extractos de ARN total de larvas de tercer estadio y se diseñaron cebadores que amplifican específicamente a cada uno de los genes. Como se observa en la figura R-4 (c) en los mutantes heterocigóticos *FD2/+* existe una reducción de,

aproximadamente, la mitad de cantidad de transcrito para ambos genes respecto al silvestre y esta reducción es bastante mayor cuando se trata de los mutantes homocigóticos *FD2/FD2*, si bien es cierto que en este último caso los niveles de transcrito de *toe* se reducen en mayor medida que los de *eyg*.

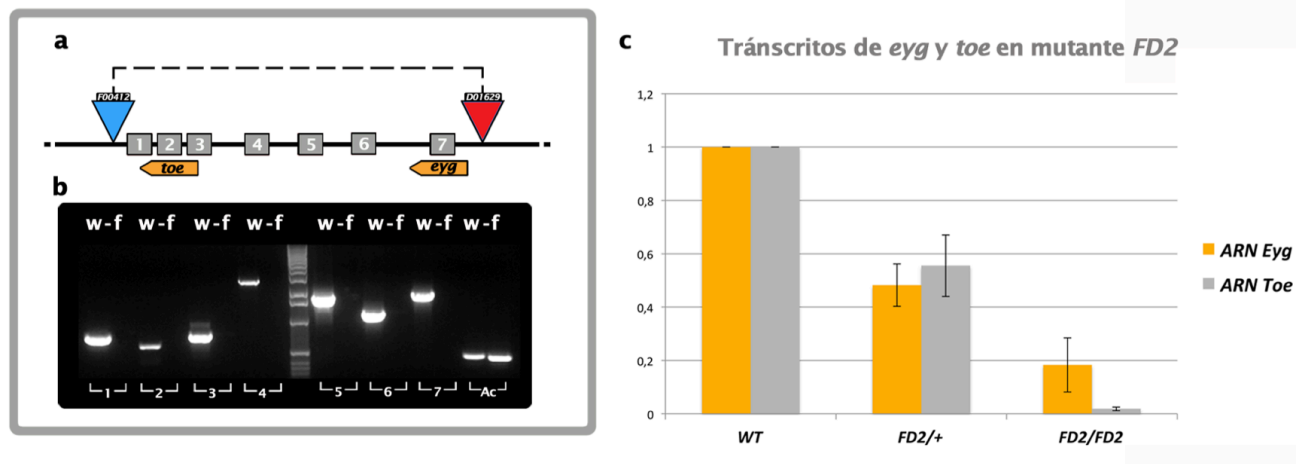


Figura R-4. Análisis molecular. (a) Representación esquemática de la región genómica del cromosoma III en la que *toe* y *eyg* están presentes junto con los transposones que los flanquean (PBac f00412 en azul y P(XP)d01629 en rojo). Se diseñaron siete parejas de cebadores (1-7) que amplifican siete zonas (cuadrados grises) presentes entre los dos genes. (b) PCR realizada con las siete parejas de cebadores (1-7) usando ADN genómico extraído de larvas de tercer estadio de genotipos silvestres (w) y *FD2/FD2* (f). No existió amplificación en las reacciones realizadas con ADN genómico *FD2/FD2* (f) mientras que sí se dio en aquellas realizadas con el silvestre (w). Se usaron como control cebadores que amplifican el gen *actina*. (c) RT-qPCR de ARN extraído de larvas wt y *FD2/FD2* con cebadores que reconocen específicamente los transcritos de *eyg* (columna naranja) y *toe* (columna gris). Ambos transcritos se reducen aproximadamente a la mitad en larvas *FD2/+* y esta reducción es mayor en larvas *FD2/FD2* para ambos genes. *eyg* se reduce más de un 80% y el caso de *toe* la reducción es prácticamente total.

Los resultados de estos experimentos demostraron que la doble mutación se había generado con éxito y que por lo tanto habíamos logrado crear un mutante doble para ambos genes.

R-2. Características fenotípicas del doble mutante *FD2*

Una vez obtenida la cepa doble mutante quisimos analizar sus características fenotípicas y compararlas con las que presentan los alelos nulos sencillos para *eyg*. A simple vista se observa que existe un aumento de la letalidad larvaria en los animales homocigóticos *FD2/FD2*, siendo

mínimo el número de larvas que alcanzan el tercer estadio y cuando éstas lo consiguen ven muy mermada su capacidad locomotora. En cambio, las larvas mutantes homocigóticas para el alelo nulo de *eyg*, *eyg*^{20MD1} (Dominguez et al., 2004) llegan casi en su totalidad a alcanzar el estadio de pupación. En ninguno de los dos casos las larvas que llegan a pupar pasan de este estadio y acaban pereciendo antes de eclosionar el adulto, debido, entre otras cosas, a que no desarrollan la región cefálica correctamente.

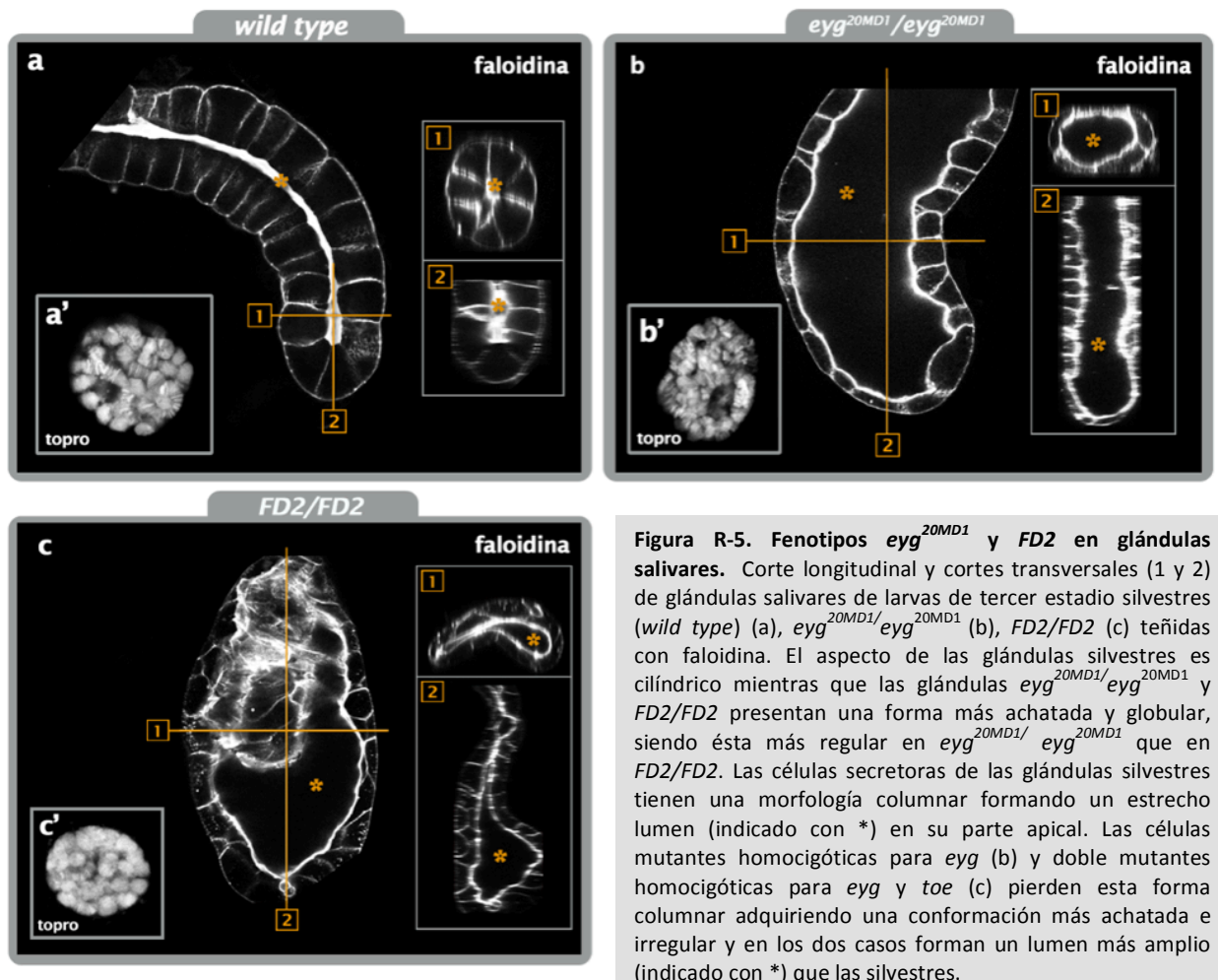


Figura R-5. Fenotipos *eyg*^{20MD1} y *FD2* en glándulas salivares. Corte longitudinal y cortes transversales (1 y 2) de glándulas salivares de larvas de tercer estadio silvestres (*wild type*) (a), *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1} (b), *FD2*/*FD2* (c) teñidas con faloidina. El aspecto de las glándulas silvestres es cilíndrico mientras que las glándulas *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1} y *FD2*/*FD2* presentan una forma más achatada y globular, siendo ésta más regular en *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1} que en *FD2*/*FD2*. Las células secretoras de las glándulas silvestres tienen una morfología columnar formando un estrecho lumen (indicado con *) en su parte apical. Las células mutantes homocigóticas para *eyg* (b) y doble mutantes homocigóticas para *eyg* y *toe* (c) pierden esta forma columnar adquiriendo una conformación más achatada e irregular y en los dos casos forman un lumen más amplio (indicado con *) que las silvestres.

(a'-c') Núcleos politénicos marcados con topro de las células secretoras de las glándulas salivares silvestres (a'), *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1} (b') y *FD2*/*FD2* (c'). En ausencia de *eyg* el bandeo que presentan estos cromosomas se ve alterado (b') y esto sucede en mayor medida cuando se eliminan las dos dosis de *eyg* y *toe*.

Otro fenotipo que presentan las larvas que portan esta doble mutación se observa en las glándulas salivares. Como podemos ver en la figura R-5, las glándulas salivares de larvas silvestres tienen un aspecto cilíndrico mientras que las pertenecientes a larvas *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1} y *FD2*/*FD2* son de aspecto más globular. De hecho, las células secretoras que forman las glándulas silvestres presentan la forma columnar típica de este epitelio y generan un lumen

muy estrecho, cosa que no ocurre en los otros dos genotipos cuyas células más achatadas desarrollan un lumen bastante más voluminoso. Además, al diseccionar glándulas de larvas *FD2/FD2*, éstas rápidamente pierden su estructura tridimensional venciéndose alguna de las paredes de la glándula hacia su lumen (Fig. R-5 c).

Los cromosomas politénicos de estas células también se ven afectados por la falta de *eyg* y *toe*. Los recuadros de la figura R-5 a' b' y c' muestran los cromosomas silvestres, *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1} y *FD2/FD2*, respectivamente. La tinción con topro muestra el bandeo típico que se origina por la alternancia de regiones eucromáticas con regiones heterocromáticas. Se puede observar como dicho bandeo se ve afectado en los cromosomas mutantes. Los núcleos politénicos pertenecientes a larvas *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1} pierden parte de este bandeo y este fenotipo se ve agravado en los núcleos *FD2/FD2*.

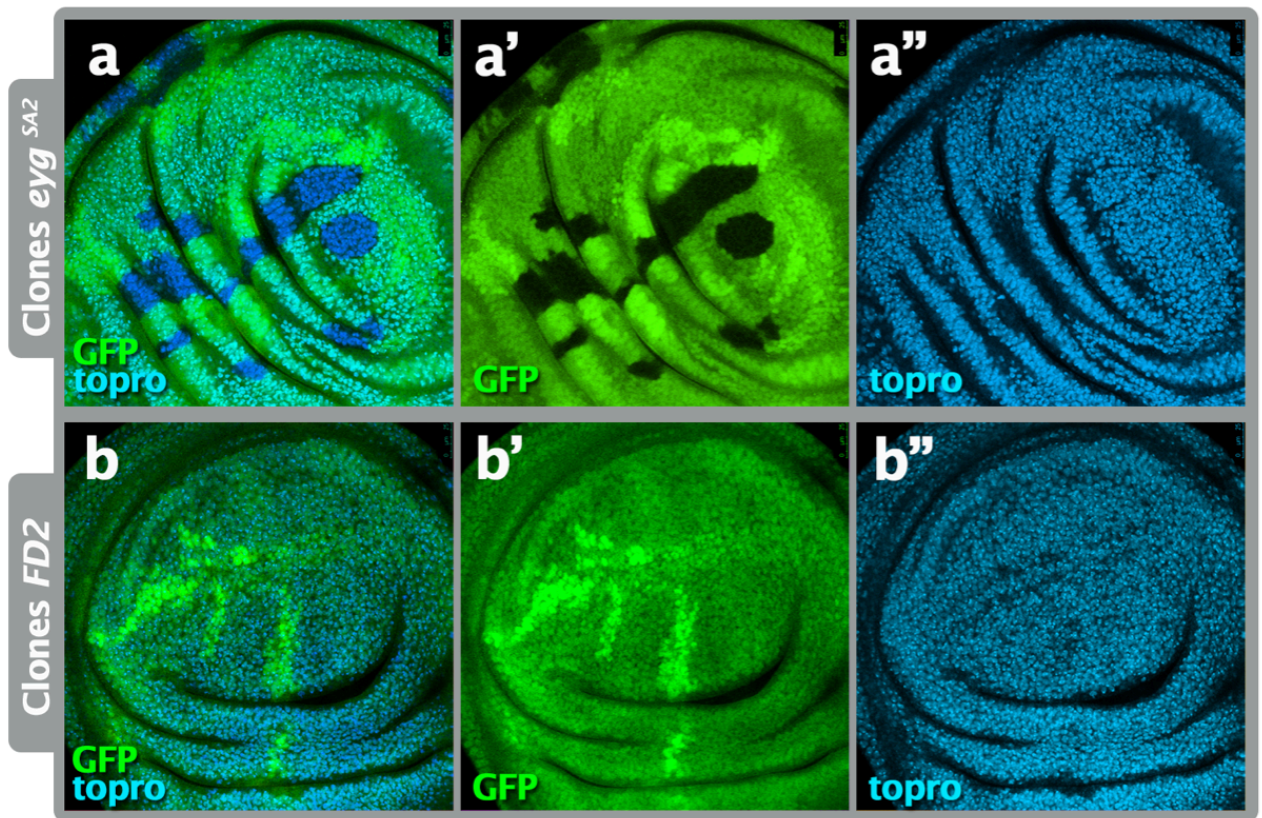


Figura R-6. Los clones *eyg*^{SA2}/*eyg*^{SA2} en el disco imaginal de ala sobreviven y los clones *FD2/FD2* mueren. Tinciones inmunohistoquímicas de discos imaginales de larvas de tercer estadio en los que generamos clones de recombinación mitótica *eyg*^{SA2}/*eyg*^{SA2} (a) y *FD2/FD2* (b). Los clones mutantes *eyg*^{SA2}/*eyg*^{SA2}, visualizados por la pérdida de señal de GFP en a', sobreviven y parecen tener un tamaño similar a sus clones gemelos (doble dosis de GFP en a'); sin embargo, sólo observamos los clones gemelos silvestres (doble dosis de GFP en b') cuando intentamos generar clones doble mutantes *FD2/FD2* que serían visualizados con pérdida de GFP en b', lo que indica que estos clones no son capaces de sobrevivir. El ADN está marcado con topro.

Otro comportamiento diferencial de la doble mutación *FD2* respecto a mutaciones nulas sencillas para *eyg* se observa a la hora de realizar clones de recombinación mitótica con el sistema Flipasa/FRT (ver materiales y métodos) en el disco imaginal de ala de larvas de tercer estadio. En la figura R-6 se muestran discos imaginales en los que inducimos clones 72 horas antes del inicio de la pupación de genotipos *eyg*^{SA2} (Fig. R-6 a) y *FD2* (Fig. R-6 b). En la figura se observa que los clones de células homocigóticas *eyg*^{SA2} crecen (células sin GFP en Fig. R-6 a') al lado de sus clones gemelos de genotipo silvestre (células con dos dosis de GFP en Fig. R-6 a') mientras que al inducir los clones de células homocigóticas *FD2* sólo observamos los clones gemelos de fenotipo silvestre (células con dos dosis de GFP en Fig. R-6 b'), lo que indica que los clones de células homocigóticas *FD2* no sobreviven. La morfología de los clones de células homocigóticas *eyg*^{SA2} (Fig. R-6 a') es redondeada. Este fenotipo es típico de falta de afinidad celular entre las células del clon con el resto del tejido que le rodea.

R-3. *Eyg* y *Toe* tienen componente materno

Las larvas homocigóticas para mutaciones nulas de *eyg*, como *eyg*^{20MD1} así como un pequeño porcentaje de las homocigóticas para *FD2* son capaces de alcanzar el tercer estadio larvario pereciendo durante la pupación. Este hecho junto con el hecho de que existe expresión de ambos genes durante el desarrollo embrionario temprano (ver más adelante) nos hizo pensar que ambas proteínas podrían estar presentes en el componente materno que deposita la madre al huevo durante la ovogénesis, lo que permitiría a las larvas sobrevivir hasta el estado de pupación.

Para comprobar la hipótesis de la existencia de componente materno de *Eyg* y *Toe* realizamos un experimento de *western blot* con embriones de dos horas de genotipos silvestre, *FD2/FD2* y huevos sin fecundar puestos por hembras vírgenes. Todos ellos los incubamos con los anticuerpos α -*Eyg*/*Toe*, que reconoce ambas proteínas y α -*Toe*, que reconoce exclusivamente a *Toe* (ver materiales y métodos). El resultado se muestra en la figura R-7. Los embriones *FD2* presentan una disminución de la cantidad de proteína *Eyg* (Fig. R-7 a) y *Toe* (Fig. R-7 b)

respecto a los silvestres. Esta baja señal de proteína podría corresponder al componente materno de ambos, ya que en puestas de esta duración los embriones no han comenzado aún la transcripción cigótica propia (Tadros y Lipshitz, 2009). Este resultado se corrobora con la banda de proteína que se observa en los carriles de huevos que no han sido fecundados, cuyo único contenido es el conjunto de ARNs y proteínas aportados por su progenitora. Además, cabe destacar que en los embriones incubados con α -Toe, la señal de Toe presenta dos bandas; una de estas bandas, la de menor peso molecular, presenta una señal más fuerte en los embriones sin fecundar que en los embriones silvestres (ver discusión).

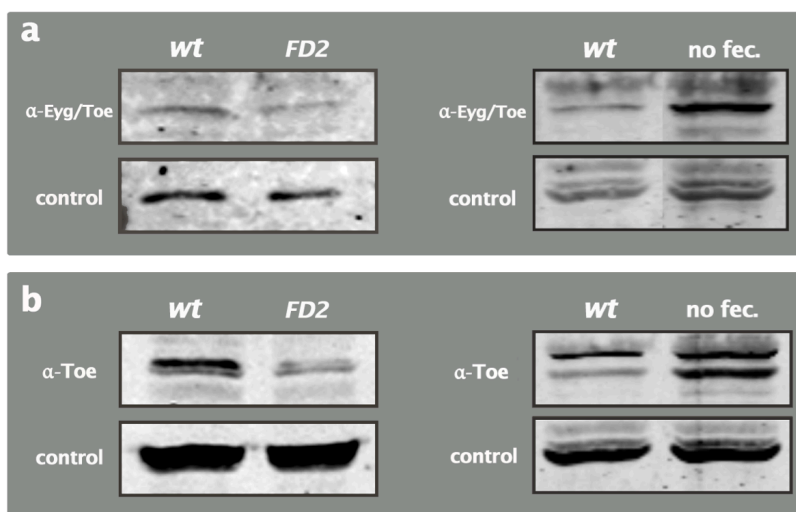


Figura R-7. Eyg y Toe tienen componente materno.

Experimento de *western blot* en el que se incubaron embriones de puestas de 1,5 horas silvestres (wt) , FD2 y embriones sin fecundar con el anticuerpo α -Eyg/Toe (a) y α -Toe (b). Los embriones FD2 muestran una reducción en la señal de proteína con ambos anticuerpos respecto al wt. Los embriones no fecundados también presentan señal con los dos anticuerpos siendo ésta mayor que en los embriones wt. Como control de carga se utilizaron bandas inespecíficas del mismo

R-4. Expresión embrionaria temprana de *eyg* y *toe*

Hasta la fecha se conoce que existe expresión embrionaria de *eyg* y *toe* gracias a tinciones inmunohistoquímicas con el anticuerpo α -Eyg/Toe e hibridaciones *in situ* contra sus ARN mensajeros que pusieron de manifiesto que ambos genes comienzan a expresarse en estadio 8-9 embrionario y que colocalizan en gran medida durante el resto del desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* (Aldaz et al., 2003, Yao et al., 2008).

Sabiendo que ambas proteínas están presentes en el componente materno quisimos averiguar cuál era la distribución de las mismas en estadios embrionarios tempranos. Por ello realizamos

tinciones inmunohistoquímicas incubando embriones en estadio de blastodermo sincitial con los anticuerpos α -Eyg/Toe y α -Toe y pudimos observar que el anticuerpo que reconoce ambas proteínas da una señal difusa tanto en el citoplasma como en el núcleo (Fig. R-8 a'' y b''); sin embargo, el anticuerpo que reconoce Toe, además de dar una señal difusa en núcleo y citoplasma similar a la que da el otro anticuerpo, también forma acúmulos que se localizan de manera apical a los núcleos del sincitio (Fig. R-8 a' y b'). Es curioso el hecho de que no parezca existir colocalización entre las señales de los dos anticuerpos (ver discusión).

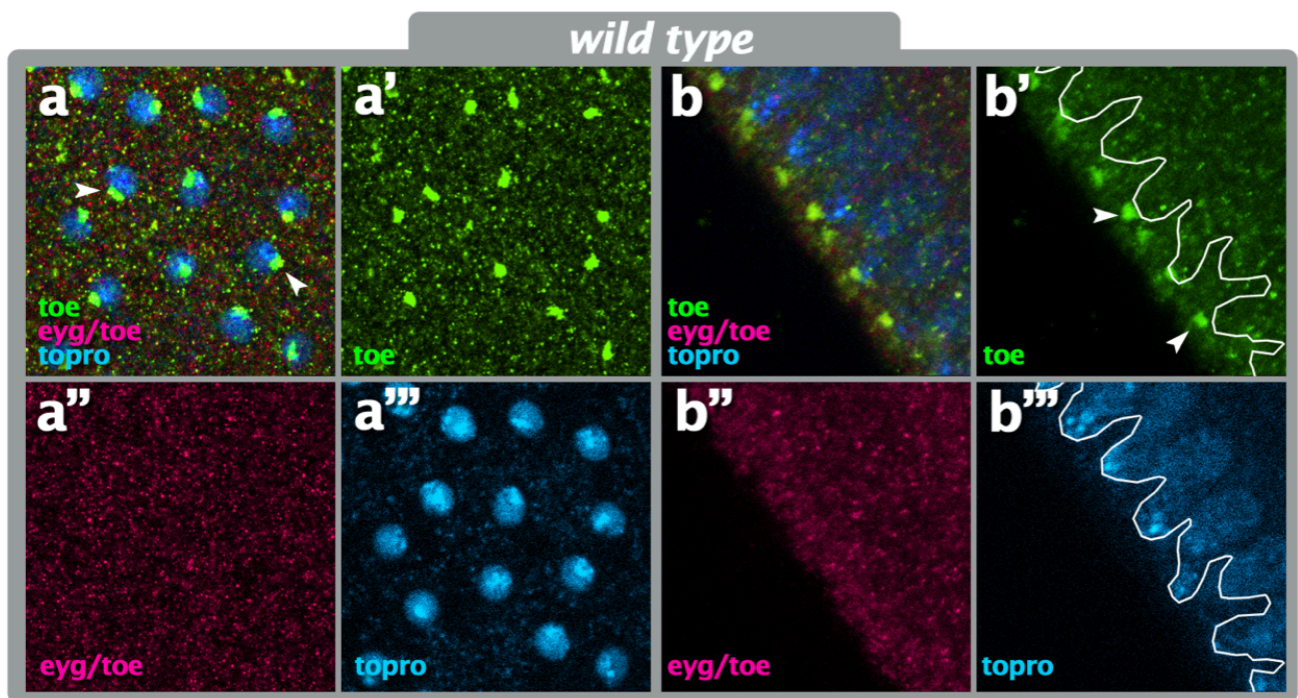


Figura R-8. Expresión de *eyg* y *toe* en el embrión temprano. Tinción inmunohistoquímica de embriones silvestres en estadio de blastodermo sincitial con los anticuerpos α -Eyg/Toe y α -Toe. **a** muestra un corte superficial de la corteza del embrión mientras que en **b** se observa un corte longitudinal a la altura de la región media del mismo. α -Eyg/Toe presenta una señal difusa tanto citoplasmática como nuclear (rojo) mientras que la tinción de α -Toe (verde), aunque también se ve difusa en núcleo y citoplasma, se acumula en regiones apicales y adyacentes a los núcleos del embrión (cabezas de flecha). Los núcleos están marcados con topro.

R-5. Eyg y Toe se expresan durante la ovogénesis

Para dar más apoyo a la hipótesis de que Eyg y Toe están presentes en el componente materno teñimos ovariolas de hembras silvestres con los anticuerpos α -Eyg/Toe y α -Toe (Fig. R-9 a). Los

dos anticuerpos dan una señal citoplasmática en los primeros estadios de la cámara del huevo que va apagándose según avanza el desarrollo (Fig. R-9 a' y a''). Además, la señal no es idéntica con ambos anticuerpos: en el caso de α -Eyg/Toe aparece una señal más fuerte concentrada alrededor de una de las células de la cámara del huevo que, por su tamaño nuclear respecto al de las células nutricias, parece tratarse del oocito. Esta señal acaba desapareciendo sobre el estadio 7 de la cámara del huevo (Fig. R-9 a''); y en el caso de α -Toe existe una señal de tinción fuerte en la cubierta epitelial que mantiene unidas las diferentes cámaras del huevo de cada ovariola (Fig. R-9 a'). Estos resultados confirman la presencia de ambas proteínas entre los productos depositados en el componente materno durante la ovogénesis.

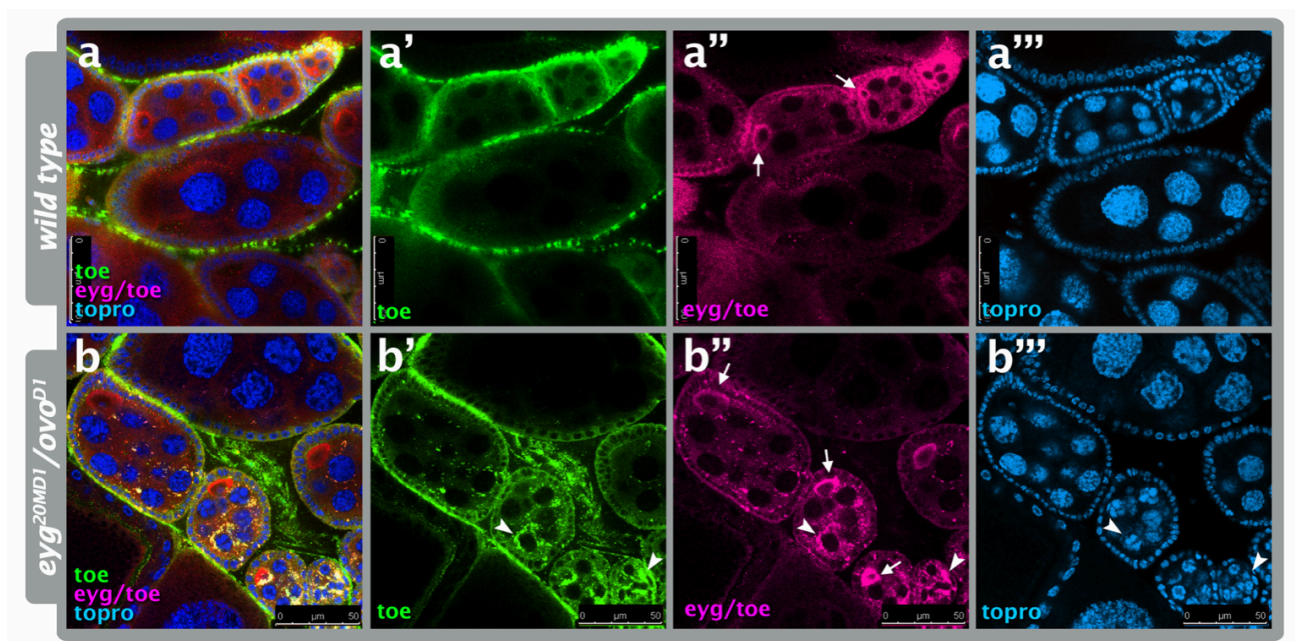


Figura R-9. Eyg y Toe se expresan durante la ovogénesis. Eyg y Toe se expresan durante la ovogénesis de *Drosophila*. Tinciones inmunohistoquímicas con los anticuerpos α -Eyg/Toe y α -Toe de ovariolas de genotipos silvestre (*wild type*) (a) y *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ (b). (a) En las ovariolas de moscas silvestres α -Eyg/Toe presenta una señal difusa en el citoplasma tanto de células nutricias como de células foliculares en los primeros estadios de la cámara del huevo y además una señal más concreta alrededor de una de las células que por tamaño nuclear parece ser el oocito (flechas), que acaba perdiéndose a medida que avanza el desarrollo (a''). α -Toe presenta también una señal difusa en el citoplasma tanto de células nutricias como de células foliculares en los primeros estadios de la cámara del huevo y otra señal más concentrada en la envuelta epitelial que recubre cada ovariola (a'). (b) En las ovariolas de las hembras que generan huevos sin componente materno de *eyg* también se observa la señal con α -Eyg/Toe concentrada alrededor del oocito (b'') además de unos puntos de tinción densa que colocan con los que presenta α -Toe (b') y ambos coinciden con la localización de fragmentaciones de ADN visualizadas con topro (b''') (cabezas de flecha).

La señal citoplasmática de Eyg y Toe tanto en ovariolas como en el blastodermo sincitial sugiere una función citoplasmática para estas proteínas. Un resultado que da apoyo a esta hipótesis se muestra en la figura suplementaria S-1. En ella se observan clones de gran tamaño de células homocigóticas para *eyg*^{SA2} en fondo *Minute* heterocigótico. La región sin GFP (Fig. S-1 a' y c') corresponde a células mutantes homocigóticas para *eyg*^{SA2}. En ellas la señal del anticuerpo α -Eyg/Toe está reducida (Fig. S-1 a'', b, c'' y d) pero no es ausente; este hecho se puede deber a la presencia de Toe que no está siendo eliminada.

R-6. La ausencia de *eyg* y *toe* produce fragmentaciones de cromatina y problemas en la secreción de la cutícula larvaria

Dado que ambas proteínas están presentes en los primeros momentos del desarrollo, quisimos analizar si esta expresión temprana es funcional. Para ello estudiamos el desarrollo de los embriones que comienzan sus divisiones sin las cantidades apropiadas de Eyg y Toe tiñiendo con topro los núcleos de embriones en estadio de blastodermo sincitial. Tanto embriones *eyg*^{20MD1} como embriones *FD2* muestran fragmentos de ADN al margen de los núcleos y dispersos en el citoplasma común del embrión (Fig. R-10 b y c, respectivamente). A estas fragmentaciones cromosómicas en el embrión temprano se unen las proteínas Eyg y Toe que están presentes en el citoplasma común del sincitio. La figura R-11 muestra la colocación de los fragmentos de ADN marcados con topro con la señal de los anticuerpos α -Eyg/Toe y α -Toe en un blastodermo sincitial de genotipo *FD2*.

Para poder analizar la función de estos factores de transcripción en las primeras etapas del desarrollo embrionario decidimos eliminar su componente materno. De esta forma, podíamos estudiar el fenotipo de los que embriones que comienzan sus divisiones en ausencia total de estos genes. Como los alelos mutantes que utilizamos, *eyg*^{20MD1} y *FD2*, son letales en homocigosis, no pudimos contar con hembras homocigóticas que pusieran huevos sin el componente materno de ambos genes; por lo cual tuvimos que utilizar un sistema alternativo.

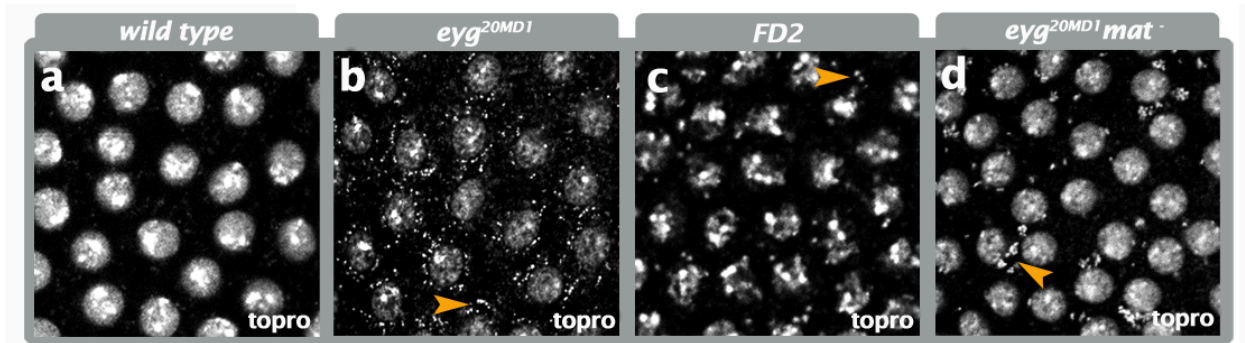


Figura R-10. Fragmentaciones de cromatina. Núcleos de embriones en estadio de blastodermo sincital. Los embriones de genotipo *eyg*^{20MD1/20MD1} (b), *FD2/FD2* (c) y *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ (d) muestran fragmentaciones cromosómicas (cabezas de flecha) alrededor de los núcleos teñidos con topro, ausentes en los embriones silvestres (*wild type*) (a).

Este sistema fue la generación de clones en la línea germinal (Chou y Perrimon, 1996) (ver materiales y métodos) mediante el cual, a través de una recombinación entre secuencias FRT únicamente en la línea germinal, obtenemos huevos cuya ovogénesis tiene lugar en ausencia de nuestro gen de interés. En este caso, sólo llegamos a obtener este tipo de embriones con el alelo *eyg*^{20MD1} ya que en el doble mutante *FD2* la alta letalidad embrionaria impidió sacar un mínimo número de muestra suficiente.

Cuando analizamos los núcleos de los embriones que se desarrollan en ausencia del componente materno de *Eyg* (*eyg*^{20MD1} *mat*⁻) teñidos con topro se repite, con mayor frecuencia que en los embriones mutantes cigóticos, la presencia de fragmentaciones de cromatina alrededor de los núcleos del citoplasma común (Fig. R-10 d).

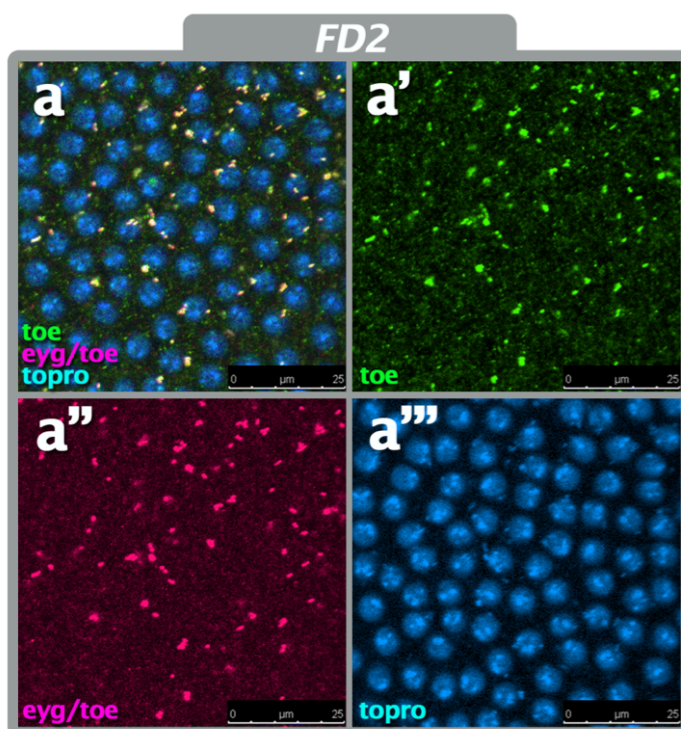
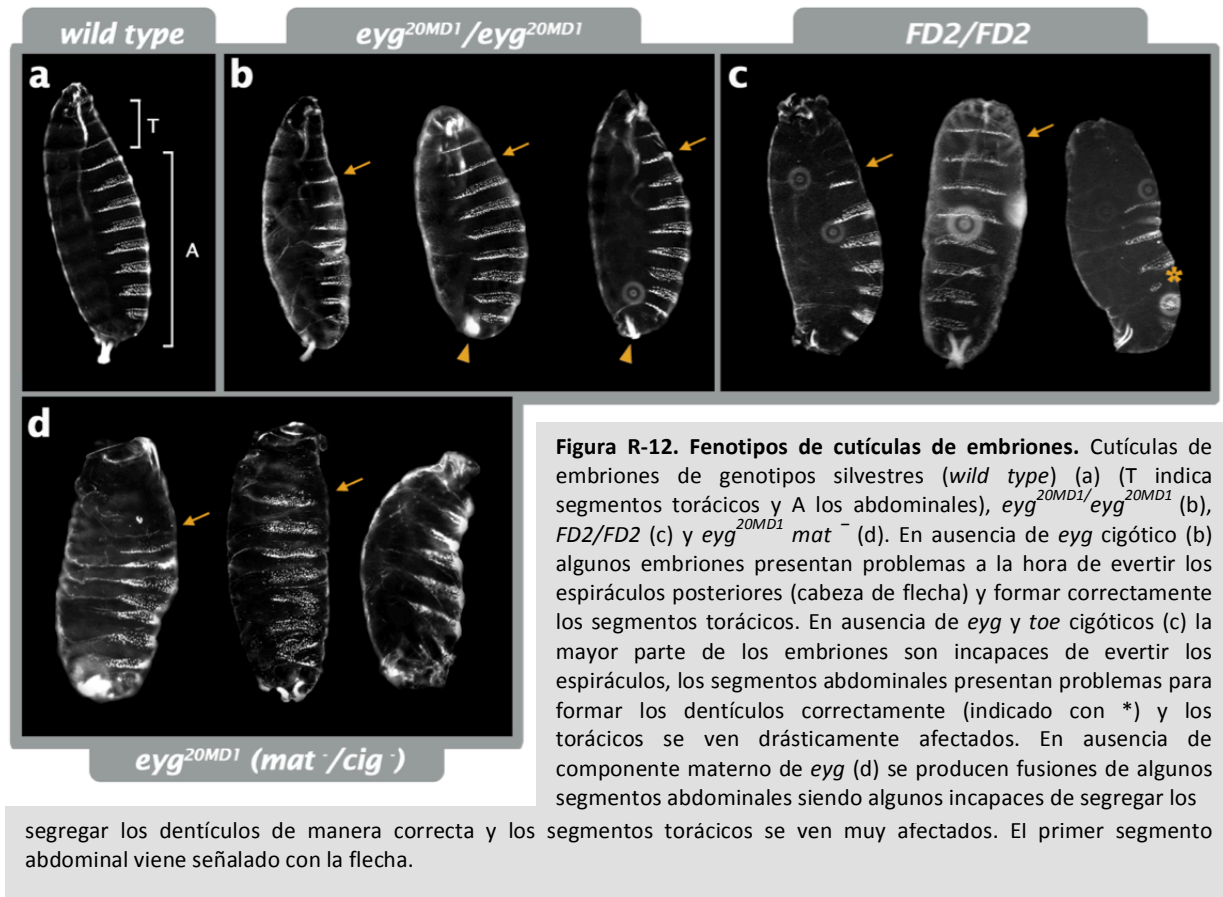


Figura R-11. Eyg y Toe se unen a las fragmentaciones cromosómicas. Tinción inmunohistoquímica de un embrión *FD2* en estadio de blastodermo sincital con los anticuerpos α -Toe (a') y α -Eyg/Toe (a''). Se observan colocalización de la señal citoplasmática de ambos anticuerpos con las fragmentos de ADN teñidos con topro (a'''). Esta colocalización se reproduce en aquellos genotipos de falta de función materna y cigótica de *eyg* y *toe*.

La figura R-9 (b) muestra ovariolos de hembras sin el componente materno de *eyg* (*ovoFLP; eyg^{20MD1}, FRT2A / ovo^{D1}*). En ellas se observan fragmentaciones de ADN alrededor de las células nutricias de la cámara del huevo que se tiñen con topro (b'''). A pesar de que los embriones carentes de componente materno presentan severos fenotipos parece que no conseguimos eliminar la presencia de *eyg* desde el comienzo de la ovogénesis; como observamos en la figura R-9 (b'') la señal de α -Eyg/Toe sigue presente de manera citoplasmática alrededor del potencial oocito al igual que ocurre en la mosca silvestre (Fig. R-9 a''). Esta expresión podría corresponder con una señal de Toe (que no es eliminada en este experimento y que no es reconocida por el anti-Toe, véase discusión) que podría estar siendo reconocida por este anticuerpo o bien a que aún no se ha producido la recombinación en la línea germinal dirigida por el gen *ovo* (recordemos que en la construcción *ovo-flipasa* la flipasa está dirigida por el promotor de este gen, véase más adelante y materiales y métodos) en el momento en el que *eyg* se está empezando a transcribir, de ahí que en estos estadios estemos visualizando la proteína. En cualquier caso, los embriones desarrollados sin el componente materno de *eyg*, *eyg^{20MD1} mat⁻*, tienen fenotipos de mayor severidad que los mutantes cigóticos, lo que corrobora nuestra idea de que existe una función muy temprana para este factor de transcripción. Al igual que se produce en los blastodermos las señales de los anticuerpos α -Eyg/Toe y α -Toe en estas ovariolos colocalizan con las fragmentaciones de ADN que presentan las células nutricias alrededor de sus núcleos.

Seguidamente quisimos analizar cómo eran las cutículas que secretaban los embriones de los genotipos *eyg^{20MD1}/eyg^{20MD1}*, *FD2/FD2* y *eyg^{20MD1} mat⁻/cig⁻* (éstos últimos carecen tanto del componente materno como del cigótico). Como se puede observar en la figura R-12 las cutículas mutantes presentan un fenotipo diferente respecto a las generadas por los embriones silvestres (Fig. R-12 a). Las cutículas de genotipo *eyg^{20MD1}/eyg^{20MD1}* tienen problemas a la hora de evertir los espiráculos posteriores y formar la región más anterior, ya sean los segmentos torácicos o la cabeza (Fig. R-12 b). Este fenotipo se ve agravado cuando se trata de embriones *FD2/FD2* ya que, además de los problemas mencionados anteriormente, los segmentos abdominales se ven afectados, no llegándose a generar alguno de ellos y los que sí se han formado tienen problemas en la secreción de los dentículos cuticulares (Fig. R-12 c). El hecho de eliminar el componente materno de *eyg* tiene como consecuencia que los pocos embriones *eyg^{20MD1} mat⁻/cig⁻* que consiguen generar la cutícula (porque la mayoría de ellos

perece en el camino) tengan un fenotipo más severo aún que los dos anteriores, mostrando casi todos ellos problemas a la hora de formar las estructuras epidérmicas a lo largo de todo el embrión (Fig. R-12 d).



R-7. Asincronía de las divisiones nucleares del blastodermo sincitial en embriones que se desarrollan en ausencia del componente materno de *eyg*

Una vez que se ha producido la fusión de los pronúcleos masculino y femenino se desencadena una serie de trece divisiones rápidas. Las nueve primeras divisiones se dan en el centro del blastodermo sincitial y a partir de ahí los núcleos migran a la superficie del embrión para sufrir

cuatro divisiones más. Más tarde comienza la celularización de los núcleos y se inicia la transcripción cigótica generándose el blastodermo celular (véase introducción).

Algunos de los embriones generados por hembras *FD2/+* presentan una falta de sincronización en sus divisiones durante el estadio de blastodermo celular. La figura R-13 muestra una serie de fotogramas que resumen diecisiete minutos de un análisis *in vivo* de un embrión *his2-RFP*; *FD2* durante los cuales tienen lugar dos divisiones; como se observa en las imágenes estas divisiones se producen de manera asincrónica en ciertas regiones del blastodermo. Además aparecen fragmentaciones cromosómicas dispersas alrededor de los núcleos, algunos repartos desiguales de carga genética, puentes anafásicos y se aprecia que los núcleos no están dispuestos homogéneamente a lo largo de la superficie embrionaria existiendo huecos en los que, o bien, los núcleos están en diferente plano o éstos están desapareciendo hacia el interior del embrión, situaciones que no se dan en los embriones silvestres.

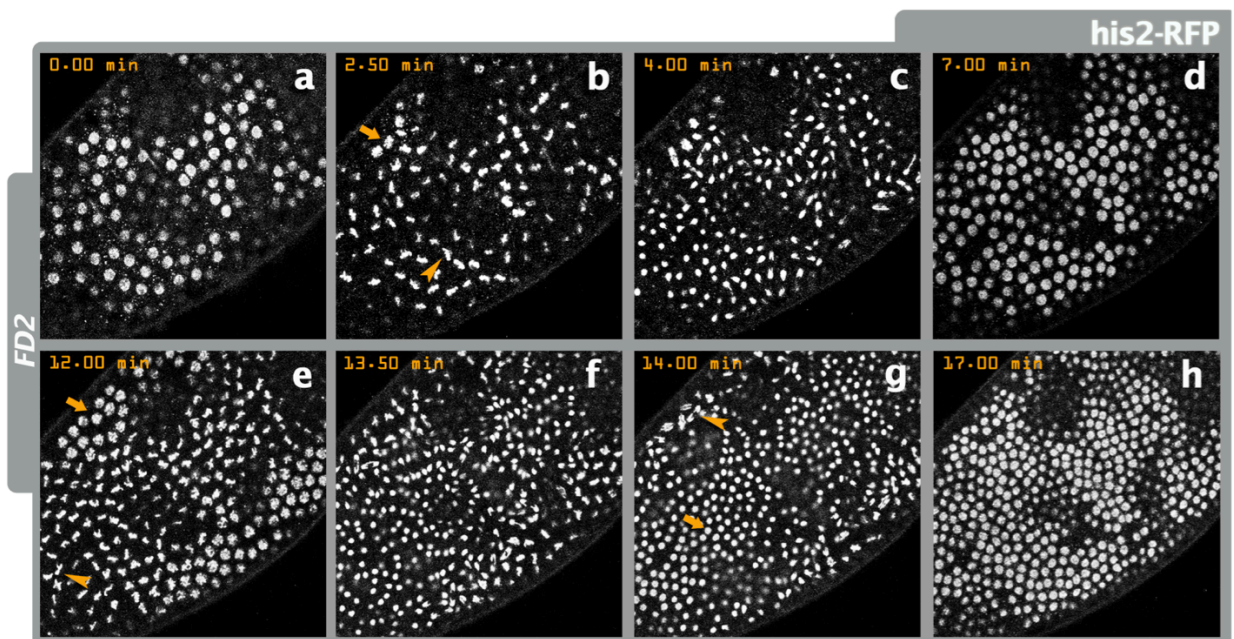


Figura R-13. Asincronía en divisiones sincitiales en embriones *FD2*. Fotogramas de un análisis *in vivo* de un embrión *FD2/FD2* en estadio de blastodermo sincitial en el que diferentes poblaciones de núcleos pierden la sincronización respecto a otras (cabezas de flechas y flechas). Además, los núcleos no se reparten homogéneamente a lo largo de toda la superficie y se observan fragmentaciones cromosómicas alrededor de los mismos. El ADN está marcado con *histona 2-RFP* (*his2-RFP*).

Este suceso se da con mayor frecuencia cuando eliminamos el componente materno de *eyg*. La figura R-14 refleja este hecho. Los embriones silvestres sincronizan sus divisiones aunque es cierto que existe un efecto “ola” muy rápido que se da de un polo del embrión hacia el otro y

hace que las divisiones de un extremo comiencen antes y se vayan sucediendo hacia el opuesto. En la figura R-14 a, la ola se produce desde la zona superior de la imagen hacia la zona inferior. Sin embargo los embriones *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ pierden esta sincronización y diferentes grupos de núcleos comienzan a dividirse a diferentes tiempos (Fig. R-14 b).

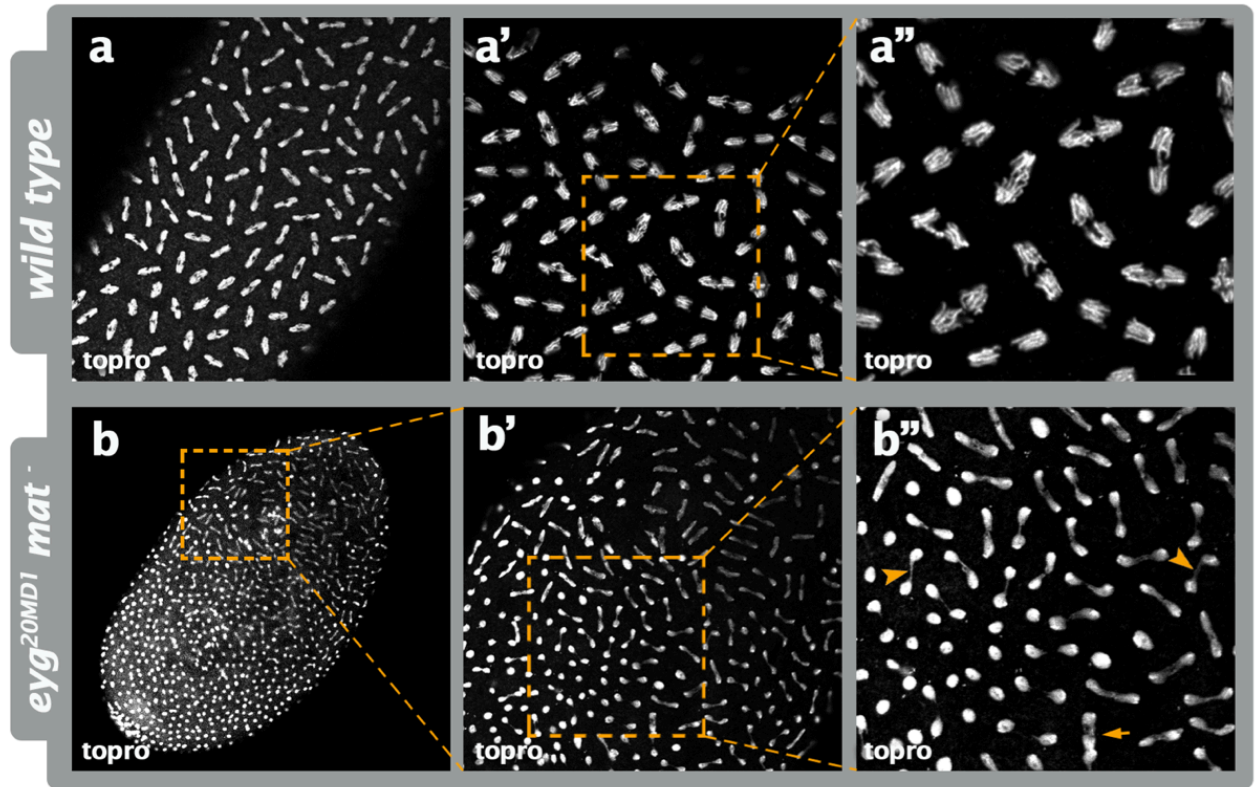


Figura R-14. Asincronía en divisiones sincitiales. Las divisiones nucleares del blastodermo sincital se producen de manera sincronizada en los embriones *wild type* (a) mientras que en ausencia de componente materno de *eyg* (b) esta sincronización se pierde en algunos núcleos en división; además, se pueden observar la aparición de puentes anafásicos (cabezas de flecha) e incluso un reparto desigual de material genético (flecha). Los núcleos están marcados con topro.

Para corroborar la asincronía en las divisiones nucleares decidimos teñir embriones silvestres y *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ con el marcador de entrada en mitosis fosfo-histona 3 (Ph3). Como vemos en la figura R-15 la tinción de Ph3 en los embriones *silvestres* es uniforme en todos los núcleos metafásicos (Fig. R-15 a-c) mientras que no ocurre lo mismo en embriones *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ donde la falta de componente materno de *eyg* produce que haya diferentes poblaciones nucleares, algunas de ellas en interfase, que no presentan señal ph3 y otras en mitosis que adquieren una tinción diferente según el estadio mitótico en el que se encuentran (Fig. R-15 d-f). Una vez más, podemos observar fragmentaciones cromosómicas alrededor de los núcleos y repartos de material genético desiguales.

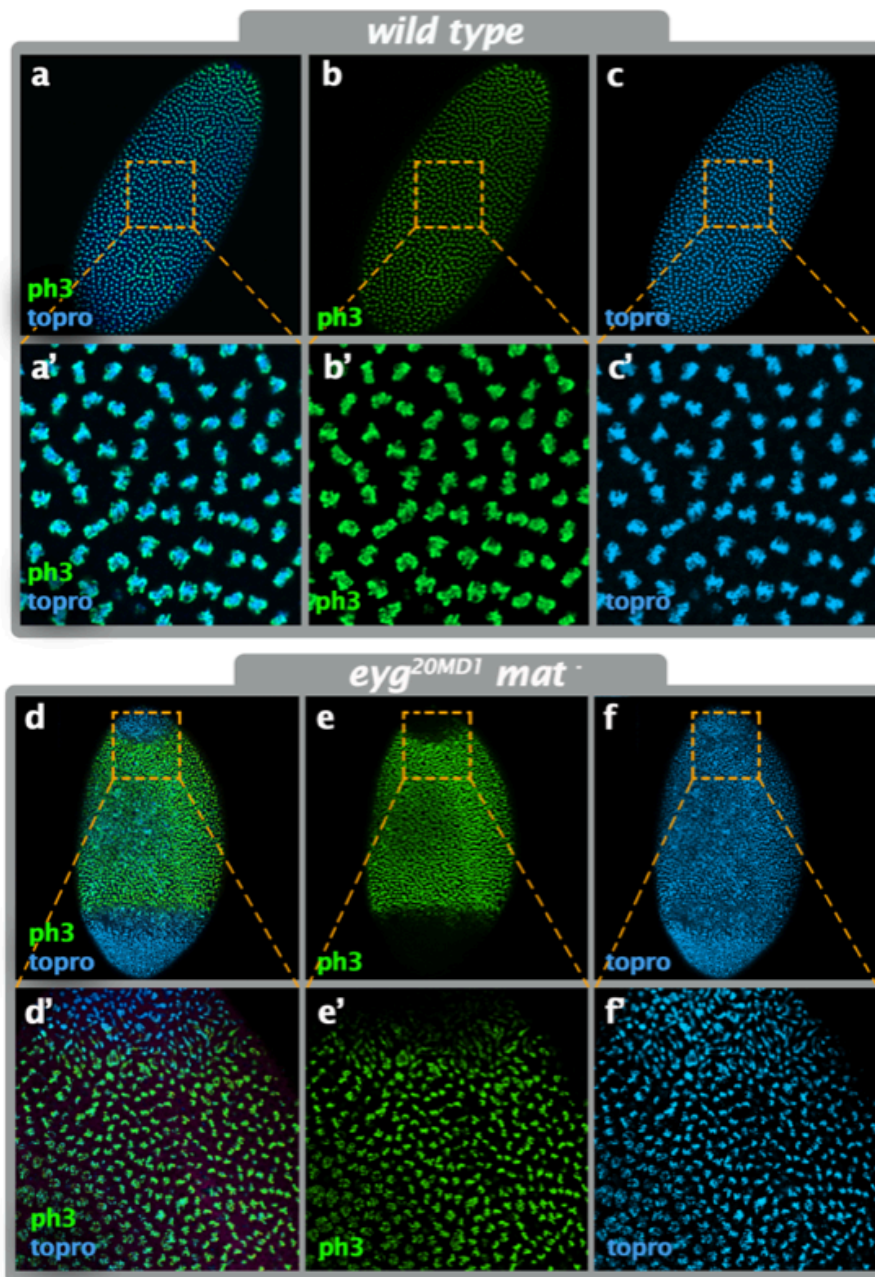


Figura R-15. Asincronía en divisiones sincitiales.

Embriones *wt* y *eyg^{20MD1} mat⁻* teñidos con α -Ph3, que marca la entrada en el ciclo mitótico. En ausencia de componente materno de *eyg* (d-f) existen grupos de núcleos con señal de Ph3 (en verde) variable en función del ciclo mitótico en el que se encuentre y otros grupos, que no presentan señal de esta marca debido a que se encuentran en interfase. Sin embargo la señal de Ph3 en el embrión silvestre (*wild type*) (a-c) es homogénea en todos sus núcleos. Los núcleos están marcados con topro.

Cuando observamos embriones más tardíos, que ya han comenzado o terminado la celularización y desarrollados en ausencia del componente materno de *eyg*, vemos las posibles consecuencias de esta falta de sincronía en las divisiones blastodérmicas. Es frecuente encontrar embriones con poblaciones de células de diverso tamaño que parecen haberse dividido a diferente ritmo las unas de las otras. En la figura R-16 se muestran embriones de este tipo en los cuales hay al menos dos grupos de células cuya tinción con topro deja ver diferentes tamaños nucleares, así como diferente estado de condensación de la cromatina entre ambas. Además, como se observa en los cortes ortogonales de la figura R-16 (c) estos

núcleos están situados a diferente profundidad respecto al córtex del embrión, siendo la localización de una población más apical que la otra.

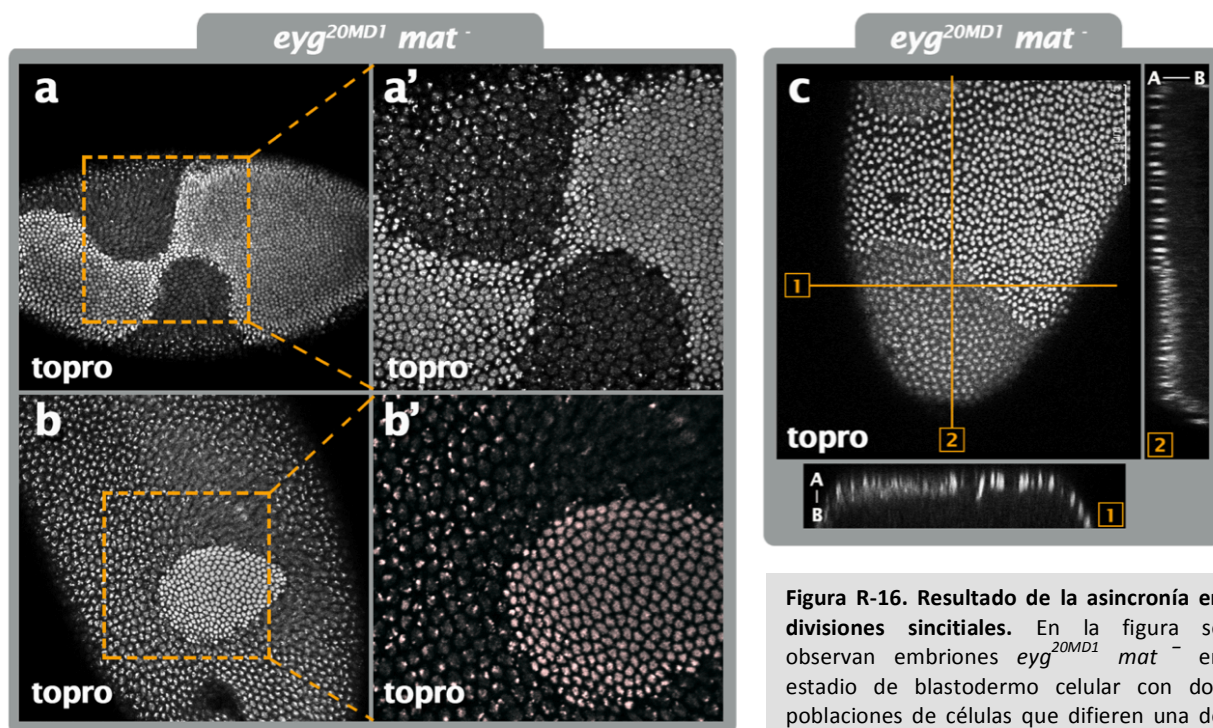


Figura R-16. Resultado de la asincronía en divisiones sincitiales. En la figura se observan embriones *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ en estadio de blastodermo celular con dos poblaciones de células que difieren una de otra en el tamaño de los núcleos así como en el estado de condensación de la cromatina (a y b).

Además estas poblaciones de núcleos se localizan diferencialmente en la corteza del embrión, siendo la posición de una más superficial o apical que la de la otra (c). A y B indican la región apical y basal de la corteza del embrión respectivamente. 1 y 2 son cortes ortogonales a los niveles indicados con la línea recta. Los núcleos están marcados con topro.

R-8. Daño en el ADN y celularización dependiente del tamaño nuclear en embriones que se desarrollan en ausencia del componente materno de *eyg*

Ya que la ausencia de estas proteínas y/o ARNs mensajeros en el componente materno genera este tipo de alteraciones, quisimos analizar si el ADN de los núcleos del blastodermo sincital padecía algún tipo de daño.

Para ello teñimos los núcleos con el anticuerpo que reconoce la histona-2Av fosforilada (his2AvP). Esta proteína forma parte de la maquinaria de reparación de la doble hélice del ADN.

El residuo serina 137 de la his2Av se fosforila allá donde se encuentra roturas de ADN de doble cadena sirviendo esta marca de señal para atraer a la maquinaria de reparación (Redon et al., 2002). Al sucederse de manera muy rápida las primeras divisiones sincitiales del desarrollo embrionario de *Drosophila*, el material genético carece de maquinaria control de divisiones o *checkpoint* que revise si estas divisiones se han producido de la manera apropiada (Rieder y Maiato, 2004). Debido a este hecho es frecuente encontrar una señal punteada basal de his2AvP en los núcleos de embriones silvestres.

La figura R-17 muestra la tinción de embriones silvestres y *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ con el anticuerpo α -His2AvP. Como podemos observar en la imagen los embriones desarrollados en ausencia de *eyg* materno presentan una señal de daño genético mayor que se localiza en acúmulos de diverso tamaño dentro de los núcleos (Fig. R-17 f y j) mientras que los núcleos silvestres muestran una señal de His2AvP más o menos uniforme y dispersa dentro de los mismos (Fig R-17 b). Estos resultados hacen pensar que la falta de *eyg* materno está generando daños en el ADN.

Quisimos además averiguar cómo se estaba produciendo la celularización de los núcleos de los embriones *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ y si esta difería de la que ocurre en los embriones silvestres. Para ello incubamos los embriones con faloidina, que marca la F-actina presente en las membranas plasmáticas de las células; observamos que en los embriones silvestres las membranas son de un tamaño uniforme debido a que todos sus núcleos presentan un diámetro similar en todo el embrión (Fig. R-17 c). Sin embargo, embriones *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ no muestran esta uniformidad a lo largo de todo el embrión debido a los diferentes diámetros de los núcleos. En la figura R-17 (j, h y k, l) se observan embriones *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ en los que los núcleos se ven rodeados de una membrana cuyo diámetro es proporcional al tamaño del núcleo en cuestión.

Como en casos anteriores, en los embriones *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ existen diferentes poblaciones de células con tamaño nuclear y estado de condensación de la cromatina diferentes (Fig. R-17 h y l) mientras que el embrión silvestre sólo existe un tipo de población de células con núcleos coordinados en la misma fase del ciclo celular (Fig. R-17 d).

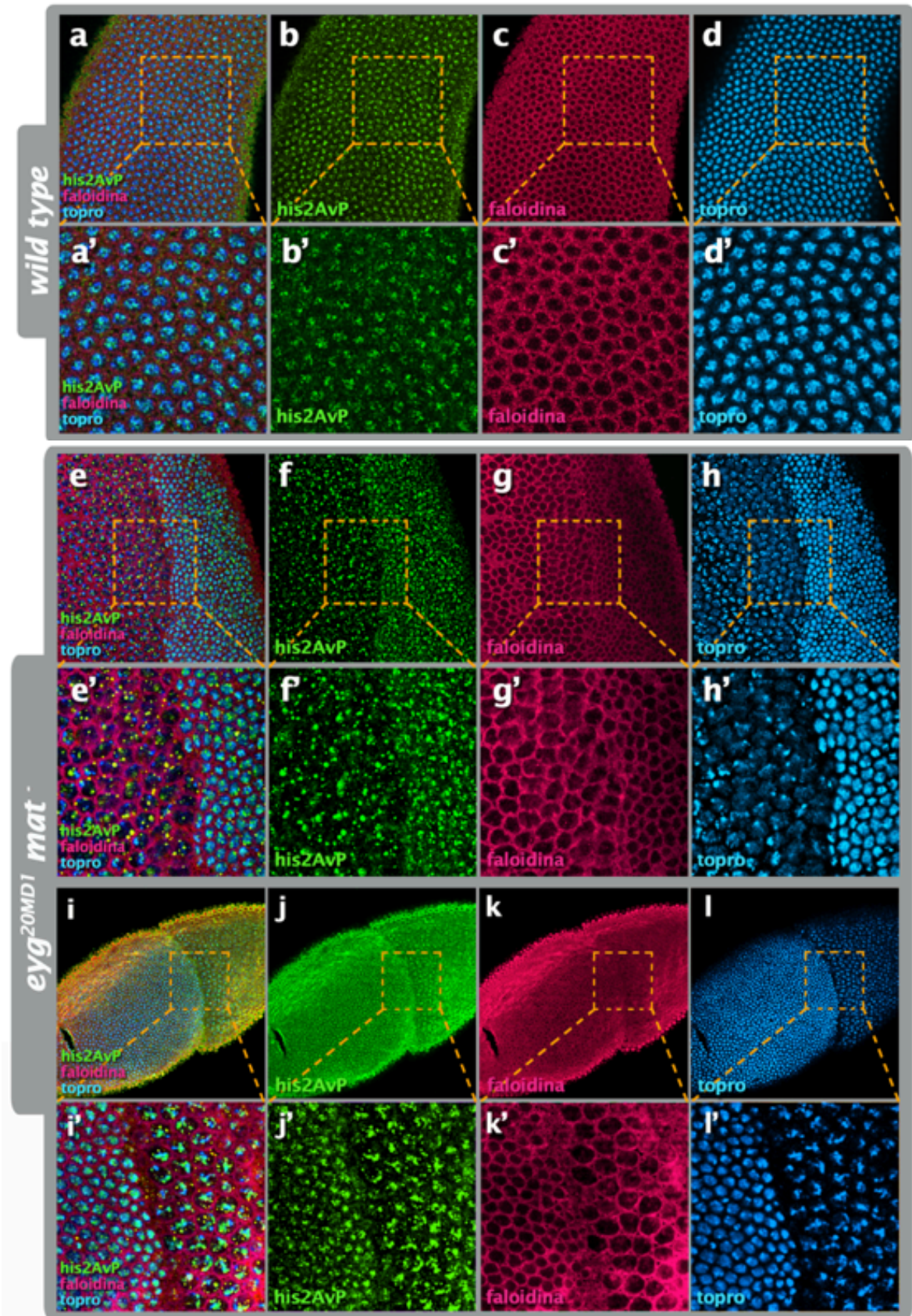


Figura R-17. Daño genético y celularización en embriones carentes de *eyg* materno. Embriones en estadio de blastodermo celular silvestre (*wt*) y *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ teñidos con α -His2Av-P (en verde) que marca el daño en el ADN, faloidina (en rojo) que tiñe las paredes celulares y topro que marca los núcleos. El embrión *wt* (a-d) muestra una expresión de His2Av-P punteada en sus núcleos (b). Sin embargo, en los núcleos de los embriones con falta materna de *eyg* (e-l) esta proteína se manifiesta en forma de acúmulos nucleares de tamaño diverso (f y j).

Los núcleos (en azul) de las células silvestres presentan un tamaño uniforme (d) que conlleva la formación de las membranas celulares de talla similar en todo el embrión (c) mientras que en los embriones *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ se observan distintas poblaciones de células con tamaño nuclear y estado de condensación de cromatina distintos (h y l) que han desarrollado paredes celulares acordes al tamaño de sus núcleos (g y k).

R-9. La ausencia de componente materno de *eyg* provoca la deslocalización de la proteína centromérica CID

Las fragmentaciones cromosómicas presentes alrededor de los núcleos de los embriones desarrollados sin las cantidades normales de *Eyg* y *Toe* sugieren la existencia de problemas a la hora de segregarse correctamente los cromosomas durante las divisiones mitóticas. Estos fallos podrían tener su origen en el hecho de que regiones de los cromosomas clave en las divisiones mitóticas no se estén ensamblando correctamente. Estas regiones son los centrómeros y telómeros, formados por heterocromatina constitutiva.

Los centrómeros se visualizan como la constricción primaria de los cromosomas y se encuentran inmersos en secuencias de ADN satélite. Estas secuencias se caracterizan por presentar una variante de la histona H3 que en *Drosophila* se conoce como CID (*Centromere Identifier Protein*). Su presencia es esencial para la función y localización normal del cinetocoro y por lo tanto para el correcto funcionamiento del centrómero (Blower y Karpen, 2001).

Quisimos analizar si los centrómeros se estaban ensamblando correctamente en ausencia del componente materno de *eyg*. La figura R-18 muestra embriones en estadio de blastodermo sincitial de genotipos silvestre (figura R-18 a) y *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ (figura R-18 b) teñidos con el anticuerpo α -CID. La señal que presenta CID en estos últimos se encuentra difusa (figura R-18 b') mientras que CID en embriones silvestres se concentra en puntos de mayor diámetro que

corresponden a cada uno de los centrómeros de los cromosomas (dos puntos por centrómero) (figura R-18 a').

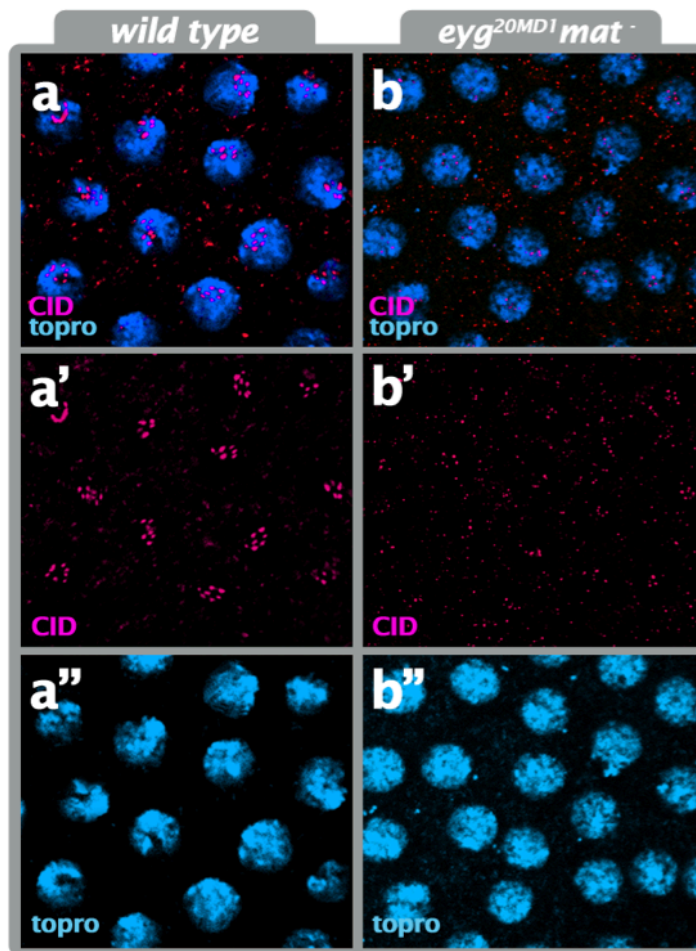


Figura R-18. La ausencia de componente materno de *eyg* provoca la deslocalización de la proteína centromérica CID.

Embriones silvestre (*wild type*) (a) y *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ (b) en estadio de blastodermo sincitial teñidos con el anticuerpo α-CID. Se observan núcleos teñidos con topro que en el caso del embrión *wild type* presentan la señal de proteína CID concentrada en forma de puntos gruesos correspondientes cada uno de ellos a cada centrómero (a') mientras que en el embrión mutante materno para *eyg* esta señal se ve reducida o difusa (b').

Estos resultados indican que el ensamblaje de los centrómeros no se está produciendo correctamente en ausencia del componente materno de *eyg*, lo que en parte explicaría las fragmentaciones cromosómicas observadas.

R-10. La ausencia de componente materno de *eyg* genera la aparición de regiones provistas de centrosomas huérfanos.

Hemos visto que la ausencia de componente materno de *eyg* genera en los embriones en estadio de blastodermo sincitial un conjunto de fenotipos que parecen estar asociados con fallos a la hora de resolverse las rápidas divisiones mitóticas de sus núcleos. Teniendo en cuenta este hecho quisimos averiguar qué aspecto tenían unos componentes citoesqueléticos clave en las divisiones mitóticas como son los centrosomas, que se encargan de sintetizar el huso mitótico que separa las cromátidas hermanas durante la segregación mitótica. Para ello, teñimos embriones con el anticuerpo contra la γ -tubulina (γ -tub). Esta proteína está presente en el material pericentriolar que embebe los centriolos (el material pericentriolar y los centriolos constituyen los centrosomas) y es requerida para que se de una correcta formación de los microtúbulos del huso mitótico en varios organismos y entre ellos *Drosophila melanogaster* (Sunkel et al., 1995).

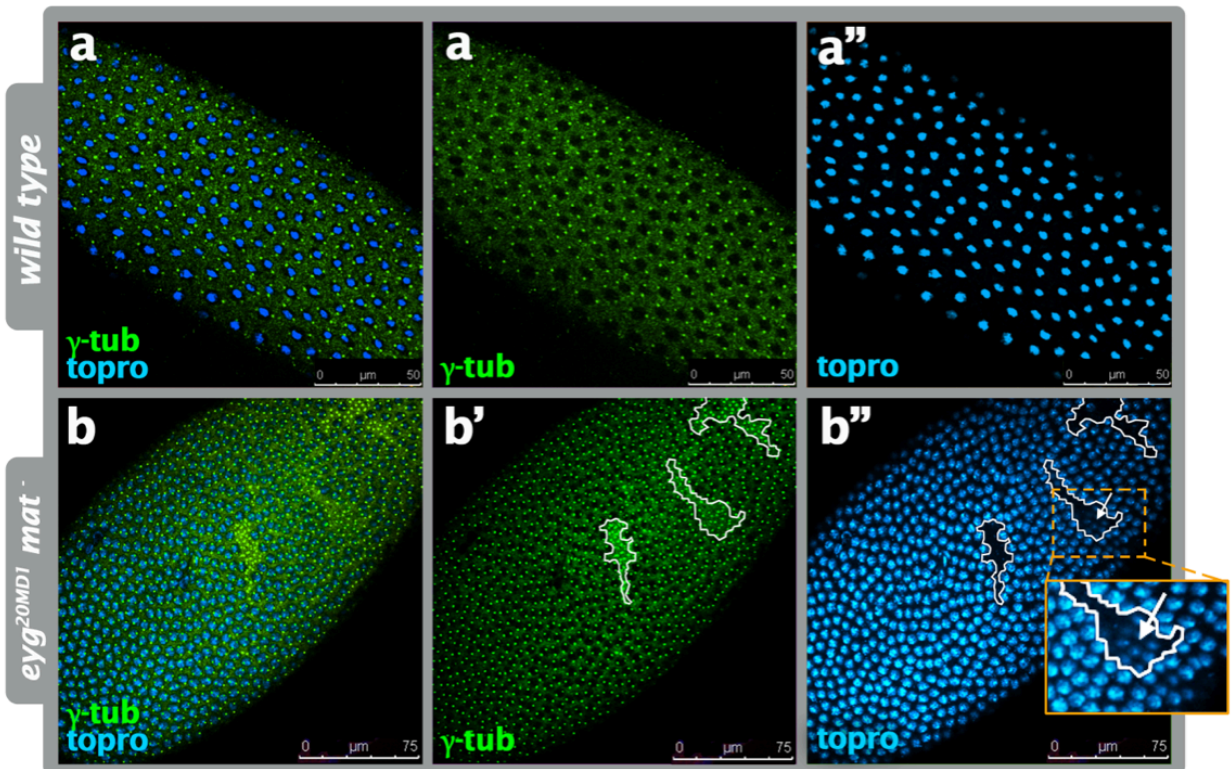


Fig. R-19. La falta de componente materno de *eyg* genera la aparición de centrosomas huérfanos. Tinción inmunohistoquímica de embriones de genotipo silvestre (*wild type*) (a) y *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ (b) en estadio de blastodermo sincitial con el anticuerpo contra γ -tubulina (γ -tub, en verde) y topoisomerasa (topro, en azul). En el embrión *wild type* se observan una pareja de centrosomas dispuestos en los polos de cada núcleo (a-a'') mientras que en el embrión *eyg*^{20MD1} *mat*⁻ existen regiones (rodeadas por la línea blanca) de centrosomas que no están asociados a núcleos denominados centrosomas huérfanos (b-b''). En b'' observamos una ampliación de una de estas regiones en las que ciertos núcleos (señalados con la flecha) parecen estar en una posición más basal respecto al resto; parece que se están hundiendo en el interior del embrión.

La figura R-19 muestra un embrión carente de componente materno de *eyg* teñido con α - γ -tub. En él se observa la tinción de cada pajera de centrosomas en los polos de los núcleos (Fig. R-19 b') y unas regiones (rodeadas por la línea blanca) que no contienen núcleos (Fig. R-19 b'') pero sí centrosomas (Fig. R-19 b'). Estos centrosomas que no están asociados a núcleos se denominan centrosomas huérfanos y normalmente no aparecen en núcleos de embriones silvestres (Fig. R-19 a'). La existencia de estas regiones parece estar relacionada con el hundimiento de los núcleos que salen del ciclo mitótico hacia el interior del embrión. Como vemos en el aumento de la figura R-19 b'' hay una serie de núcleos que están en un plano más basal y que parece que se están hundiendo hacia el interior del embrión.

R-11. El sistema *Maternal-Gal4>UAS-ARN interferente* como alternativa a los clones de la línea germinal

Los resultados anteriores sugerían que la falta de función de los factores de transcripción *eyg* y *toe* podría estar creando problemas a la hora de ensamblar y/o mantener la conformación compacta de la heterocromatina centromérica, pericentromérica y telomérica.

En levaduras se ha visto que es necesaria la transcripción llevada a cabo por la ARN polimerasa II de las secuencias repetidas de ADN satélite y el posterior procesamiento de los transcritos por la maquinaria del ARN interferente (ARN-i) para que se de un correcto ensamblaje de las regiones centroméricas y un funcionamiento preciso del centrómero (Volpe et al., 2002, Volpe et al., 2003, Verdel et al., 2004, Djupedal et al., 2005, Kato et al., 2005, Folco et al., 2008). En *Drosophila* es necesaria la presencia de *argonaute-2*, un componente del complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*) para el correcto ensamblaje de la heterocromatina centromérica (Deshpande et al., 2005). Además, se ha demostrado que la transcripción de secuencias de

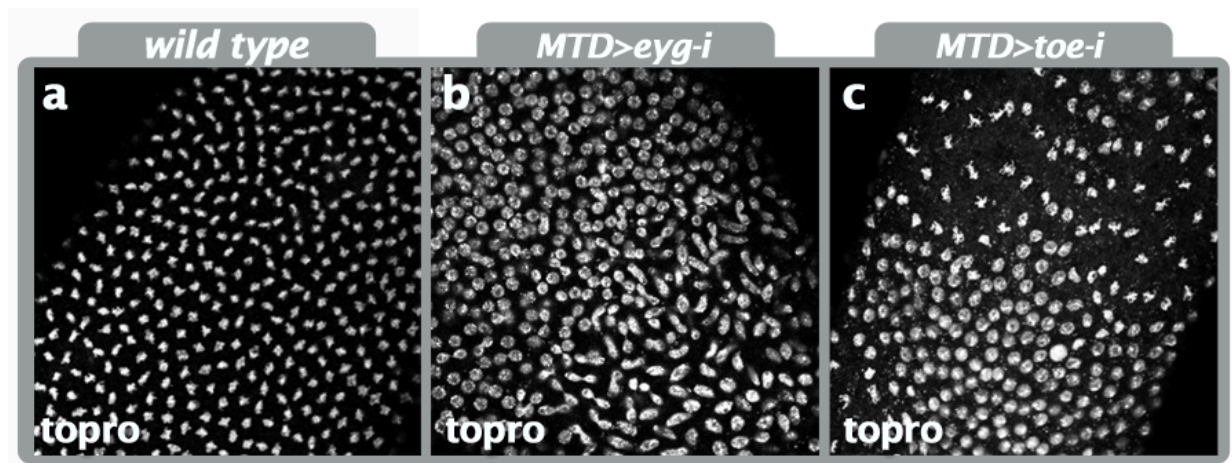
ADN satélite centroméricas y pericentroméricas de la familia 1.688 de *Drosophila* está controlada por la maquinaria del ARN-i (Usakin et al., 2007). Estos hechos unidos a resultados previos de nuestro laboratorio que pusieron de manifiesto que la falta de función materna del factor de transcripción *homothorax* (*hth*) provocaba la deslocalización de CID, segregación cromosómica aberrante y la disminución de cantidad de transcrito de la secuencia satélite 359-*pb* (Salvany et al., 2009) nos hicieron pensar que la falta de componente materno de *eyg* pudiera estar produciendo una disminución de la transcripción de secuencias de ADN satélite que podrían explicar los fenotipos observados hasta ahora.

Por ello quisimos averiguar si ciertas regiones satélites centroméricas y pericentroméricas estaban siendo correctamente transcritas en ausencia de componente materno de *eyg*. Nos dispusimos a realizar experimentos de RT-qPCR de embriones *eyg*^{20MD1} *mat*⁻, pero lo cierto es que el bajo número de embriones obtenidos por puesta mediante el método de generación de clones de la línea germinal nos hizo imposible trabajar molecularmente con ellos. Debido a ello, recurrimos a otro sistema descrito más recientemente: el sistema Maternal-Gal4>UAS-ARN-interferente. Este sistema se basa en el sistema Gal4-UAS (Brand y Perrimon, 1993) para disminuir los niveles de transcrito de un gen durante el proceso de ovogénesis. Lo hace expresando ARNs interferentes contra los genes de interés bajo el control de un promotor materno (Staller et al., 2013). En nuestro caso utilizamos como promotor el promotor triple *Maternal Triple Driver* (MTD). Este sistema a parte de poseer la ventaja de que permite contar con gran número de embriones a analizar en cada puesta, también nos permite utilizar un ARN-i específico contra *eyg* y otro contra *toe*.

Como observamos en la figura R-20 (d), los embriones de genotipos *MTD-Gal4; UAS-ARN-i-eyg* (*MTD>eyg-i*) y *MTD-Gal4; UAS-ARN-i-toe* (*MTD>toe-i*) presentan niveles muy reducidos del transcrito diana. Sin embargo, es importante reseñar que los niveles del otro transcrito también se reducen de manera significativa, a pesar de no estar presente el ARN-i dirigido contra él.

Estos embriones presentan fenotipos similares a los observados en mutantes cigóticos y maternos de *eyg* y *toe*, como son las fragmentaciones de la cromatina y la asincronía en las divisiones mitóticas (Fig. R-20 a-c). Este hecho, junto con la mencionada reducción en los

niveles de transcrito nos ha dado la suficiente confianza como para emplear estos embriones



para los análisis moleculares.

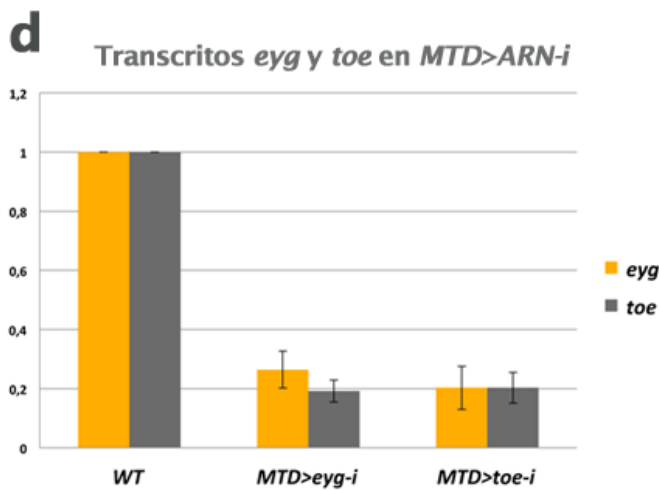


Figura R-20. Sistema *Mat-G4>ARN-i* como alternativa a los clones de la línea germinal. (a-c) Embriones en estadio de blastodermo sincitial silvestres (*wt*) (a) *MTD>eyg-i* (b) y *MTD>toe-i* (c). En los dos últimos se observan los fenotipos obtenidos al reducir el componente materno de *eyg* y *toe* como son la aparición fragmentaciones de cromatina, la asincronía en las divisiones mitóticas de sus núcleos y un espaciado irregular entre núcleo y núcleo. El ADN está marcado con topro.

(d) Gráfica de RT-qPCR que representa la abundancia de transcritos de *eyg* y *toe* en los embriones *MTD>eyg-i* y *MTD>toe-i*, respecto a los *wt*. En ambos casos los transcritos de los dos genes se ven reducidos en niveles cercanos al 80%.

R-12. En ausencia de componente materno de *eyg* y *toe* disminuye la cantidad de transcritos de secuencias de ADN satélite.

Con esta nueva herramienta hemos analizado la abundancia de los transcritos de tres regiones de ADN satélite de la familia de 1.688: las regiones pericentroméricas 260-pb, en el brazo L del cromosoma II y 361-pb en el brazo L del cromosoma III, y la región centromérica del

cromosoma X 359-pb. Estas secuencias se repiten en tándem en dichas localizaciones y su longitud es de 260, 361 y 359 pares de bases respectivamente. (Usakin et al., 2007).

El análisis de la cantidad de transcritos lo llevamos a cabo mediante un experimento de RT-qPCR con primers específicos que reconocen cada una de las tres secuencias. Como se observa en la figura R-21 (a), los embriones *MTD>eyg-i* y *MTD>toe-i* ven drásticamente reducidos los niveles de transcritos de las tres regiones respecto a los embriones silvestres (*wt*). A su vez, a modo de control, medimos la abundancia de los tres transcritos en embriones en los que disminuimos el componente materno del factor de transcripción *twist* (*twi*). Obtuvimos también reducción de los transcritos en estos embriones aunque ésta fue mucho menor que las producidas por la falta de *eyg* y *toe*. De hecho, cuando observamos los niveles de transcritos relativizando éstos a los *MTD>twi-i* en vez de a los *wt* observamos una bajada en sus cantidades de, al menos, el 80% (Fig. R-21 b). En cualquiera de los casos la disminución en la cantidad de éstos transcritos parece ser mayor en embriones *MTD>toe-i* que en *MTD>eyg-i*, a pesar de que, como hemos visto en el apartado R-11, el uso de ambos ARN-i genera una disminución muy pareja de los mensajeros de los dos genes.

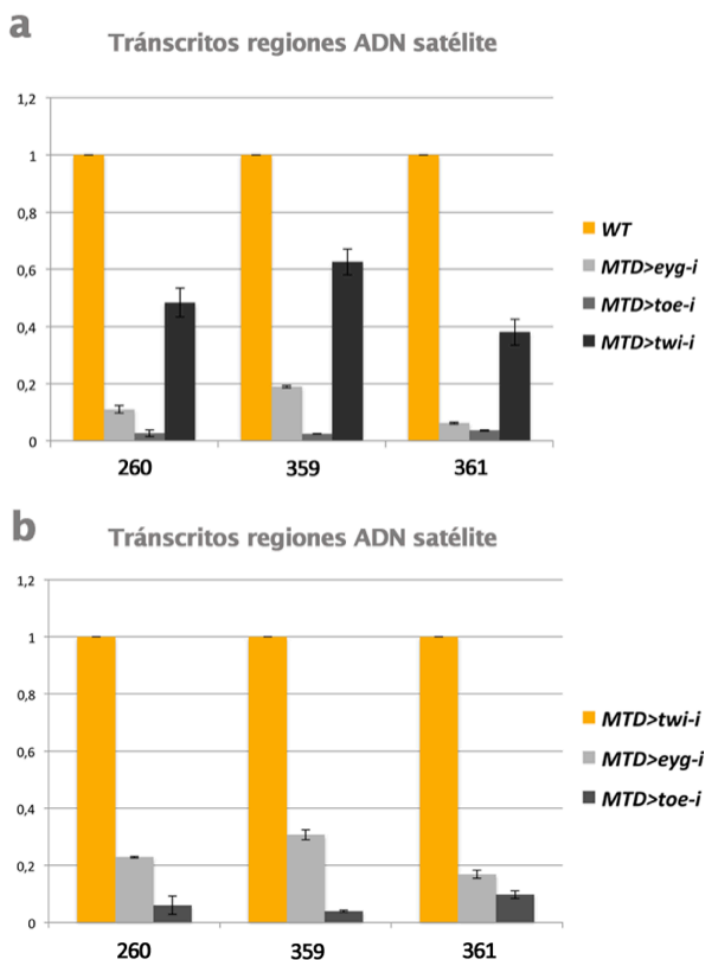


Figura R-21. Reducción en los niveles de transcrito de secuencias de ADN satélite en embriones con componente materno de *eyg* y *toe* reducido. (a) Gráfica que representa la abundancia de transcritos de las regiones de la familia 1.688 de ADN satélite 260-pb, 359-pb y 361-pb en embriones *MTD>eyg-i*, *MTD>toe-i* y *MTD>twi-i*, como control, respecto a los silvestres (*wt*). En ella observamos una reducción de al menos el 80% en los embriones con *eyg-i* y de aproximadamente el 96% en *toe-i*, mientras que en *twi-i* la reducción máxima es de, aproximadamente, el 60%. (b) Gráfica que representa la abundancia de transcritos de las regiones de ADN satélite 260-pb, 359-pb y 361-pb en embriones *MTD>eyg-i* y *MTD>toe-i* respecto a *MTD>twi-i*. Los embriones *eyg-i* disminuyen la cantidad de los tres transcritos en, aproximadamente, un 80% mientras que en aquellos *toe-i* la reducción es mayor, llegando incluso al 97% en la región 359.

R-13. La ausencia de *eyg* genera problemas en la estructuración de los telómeros

Resultados previos de nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que *eyg* y *toe* se localizan en regiones heterocromáticas de cromosomas politénicos de las glándulas salivares (Salvany et al., 2012). Como se puede observar en la figura R-22 (a-c) ambas proteínas también están presentes en otras regiones de cromosomas politénicos formadas por heterocromatina constitutiva como son los telómeros.

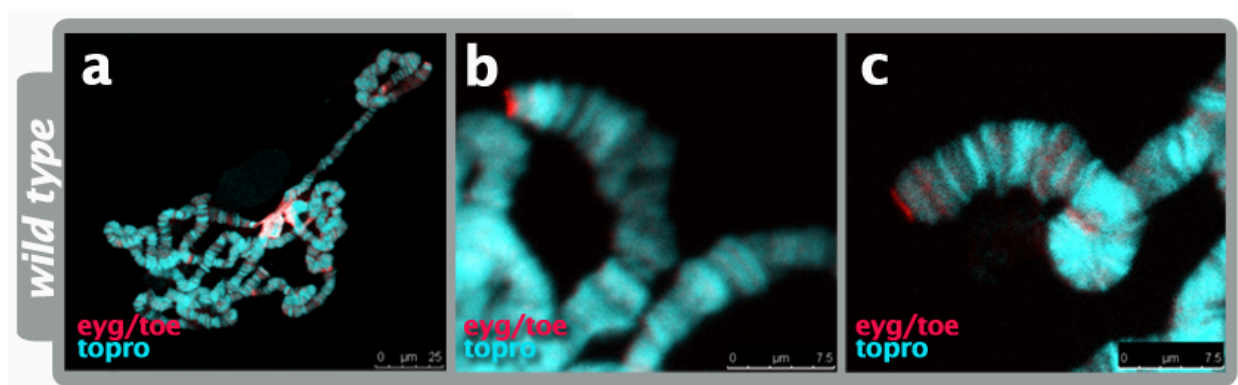


Figura R-22. Eyg y Toe se expresan en el cromocentro y los telómeros de cromosomas politénicos. Expresión de Eyg y Toe (en rojo) en cromosomas politénicos de larvas de tercer estadio silvestres. Ambas proteínas se localizan en regiones heterocromáticas como el cromocentro (a) y los telómeros (a, b y c). Además existe expresión en otras zonas a lo largo de los brazos cromosómicos.

R-13.1 *eyg* se comporta como un supresor del efecto de posición telomérica

La presencia de Eyg y Toe en los telómeros de cromosomas politénicos sugiere un posible papel de ambas proteínas en esta región cromosómica. Para averiguar si existe esta función decidimos realizar un experimento de análisis del efecto de posición telomérica (TPE: *Telomere Position Effect*, ver introducción). Utilizamos la estirpe *w; P(w^{var})* que contiene un elemento P insertado en la región telomérica del cromosoma II, concretamente entre las regiones HTT y TAS (Fig. R-23 a) (Golubovsky et al., 2001). Este inserto lleva un gen *white* (*w*) que en condiciones silvestres se encuentra silenciado debido a la proximidad de las secuencias TAS,

cuya conformación heterocromática ejerce un efecto de silenciamiento génico sobre él y las moscas presentan un color de ojo anaranjado (Fig. R-23 b). Cuando eliminamos una dosis de *eyg* algunas moscas presentan un fenotipo de ojo variegado, en el cual en ciertas células se desreprime el gen *w* del elemento P y llega a expresarse el pigmento (Fig. R-23 c y d). Es posible que la ausencia de *eyg* provoque que la cromatina de la región TAS adquiera una conformación más laxa, es decir, pierda compactación y que ello facilite la transcripción del transgen (Fig. R-23 a), lo que sugiere que *eyg* se está comportando como un supresor del TPE.

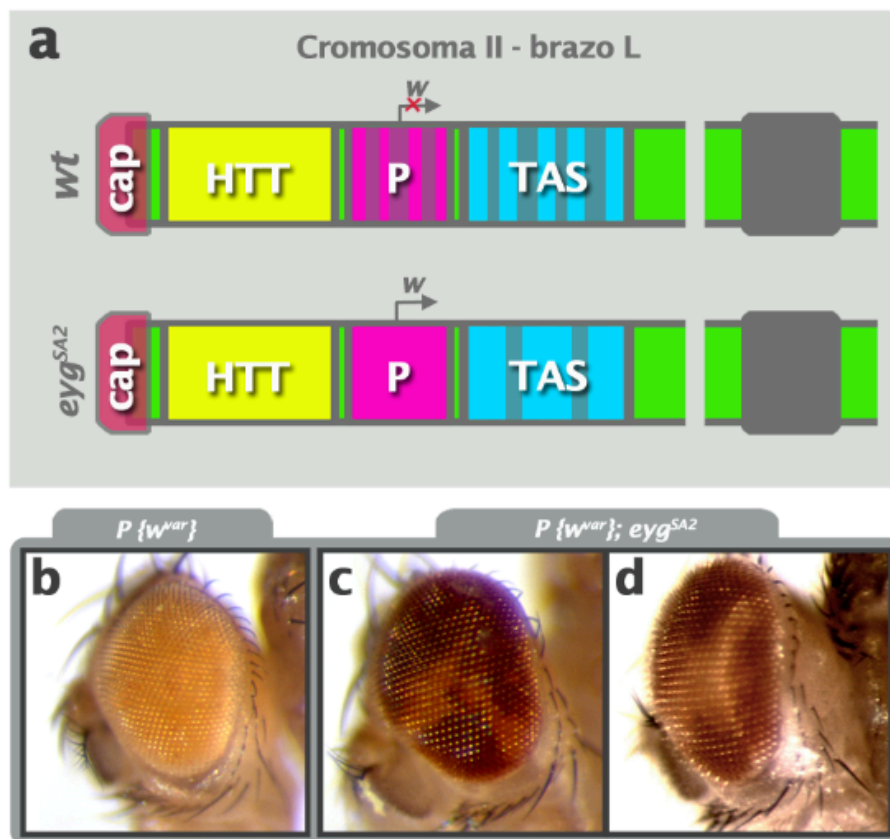


Figura R- 23. *eyg* se comporta como un supresor de TEP. (a) Figura esquemática que representa el telómero del brazo L del cromosoma II que lleva insertado el elemento $P(w^{var})$ el cual contiene un transgen *white* (*w*). En fondo silvestre (*wt*) el gen *w* está silenciado mientras que en fondo *eyg^{SA2}/+* *w* se desreprime y comienza a transcribirse en ciertas células creando un fenotipo variegado. **(b-d)** Ojos de moscas de genotipo *w; P(w^{var})* (b) y *w; P(w^{var}); eyg^{SA2}/+* (c y d).

Al eliminar una dosis de *eyg* el ojo presenta un aspecto variegado que indica que en algunas células el gen *w* del elemento P no está silenciado y puede transcribirse dando lugar a pigmento (c y d). Esta inserción en fondo *wt* presenta un color amarillo pálido uniforme en todo el ojo (a).

En este caso el alelo utilizado para eliminar una dosis de *eyg* fue el también alelo nulo *eyg^{SA2}*. La razón por la que lo usamos en vez del habitual *eyg^{20MD1}* fue que este último está generado por la inserción de un elemento P que da lugar a la expresión del gen *w* en forma de triángulo

en la región anterior del ojo, hecho que podría confundir a la hora de visualizar el fenotipo variegado (Dominguez et al., 2004).

R-13.2 La ausencia de *eyg* produce figuras cromosómicas aberrantes

Una vez comprobado que *eyg* tiene una función en el mantenimiento de la conformación heterocromática de los telómeros quisimos analizar si la segregación cromosómica ocurría de forma normal en larvas con dosis reducidas de *eyg*. Para ello, empleamos la técnica de *squash* o aplastados del sistema nervioso central (SCN) de larvas de tercer estadio. En el SCN los neuroblastos y las células madre ganglionares están en casi continua división en estos estadios lo que aumenta la probabilidad de encontrar figuras mitóticas.

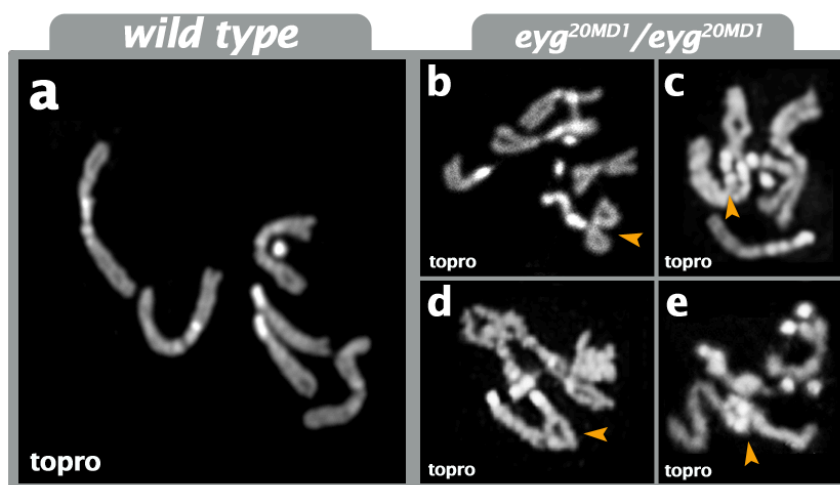


Figura R-24. La falta de *eyg* genera figuras cromosómicas aberrantes. Figuras cromosómicas de cerebros de larvas de tercer estadio de genotipos silvestre (*wt*) (d) y *eyg^{20MD1}/eyg^{20MD1}* (e-h). La ausencia de *eyg* produce figuras cromosómicas aberrantes (cabezas de flecha) y regiones heterocromáticas ectópicas.

Como muestra la figura R-24 (e-h) tan sólo fuimos capaces de obtener figuras mitóticas de larvas mutantes homocigóticas para *eyg* (*eyg^{20MD1}/eyg^{20MD1}*) y para organismos silvestres. En las larvas mutantes podemos observar algunas figuras cromosómicas aberrantes (Fig. R-24 e-h) que no se dan en los cromosomas silvestres (Fig. R-24 d). No hemos observado las fusiones teloméricas típicas de fenotipos de falta de función de proteínas que forman parte del *cap* telomérico que provocan que dos cromosomas homólogos queden unidos por sus telómeros al finalizar la mitosis. Sin embargo, sí hemos detectado lo que parecen ser uniones entre

cromátidas hermanas del mismo cromosoma y algunos puntos que presentan una fuerte tinción de topro que podrían corresponder a regiones heterocromáticas ectópicas (Fig. R-24 e-h).

R-13.3 Disminución de abundancia de transcritos de regiones HTT y TAS

Los telómeros en *Drosophila melanogaster* se dividen en tres dominios: el *cap* telomérico o conjunto proteico que protege el final del cromosoma, la región donde están presentes los retrotransposones o HTT, y más allá de la región HTT, en dirección al centrómero, están las secuencias subteloméricas TAS que ejercen un efecto de heterocromatinización sobre la región HTT.

Los resultados obtenidos en los experimentos de análisis de TPE descritos anteriormente sugieren que en ausencia de *eyg* la cromatina telomérica no se compacta correctamente. En analogía a lo que ocurre con las secuencias de ADN satélite centroméricas y pericentroméricas cuya transcripción se ve disminuida en mutantes maternos para *eyg* y *toe*, quisimos comprobar si el dominio TAS está siendo transcrito y en ese caso si la cantidad de transcritos se ve alterada en ausencia del componente materno de ambos genes.

Para ello recurrimos, de nuevo, al sistema *Mat-Gal4>UAS-ARN-i*. Mediante RT-qPCR medimos la cantidad relativa de los transcritos TAS de embriones no superiores a seis horas de edad de los genotipos *MTD>eyg-i* y *MTD>toe-i* y como control *MTD>twi-i*. Como vemos en la gráfica de la figura R-25 (a) la cantidad de transcrito se ve reducida en los embriones que expresan los ARN-i contra *eyg* y *toe* respecto a los silvestres. El genotipo *MTD>twi-i* también presenta reducidos sus transcritos TAS aunque en menor medida; la gráfica de la figura R-25 (b) muestra la cantidad de transcrito TAS en embriones *MTD>eyg-i* y *MTD>toe-i* respecto a embriones *MTD>twi-i*. El efecto que ejerce la disminución específica de los factores de transcripción *eyg* y *toe* sobre la transcripción de esta región es de una bajada de niveles del 90% con ambos

interferentes respecto a la disminución específica generada por otro factor de transcripción como *twi*.

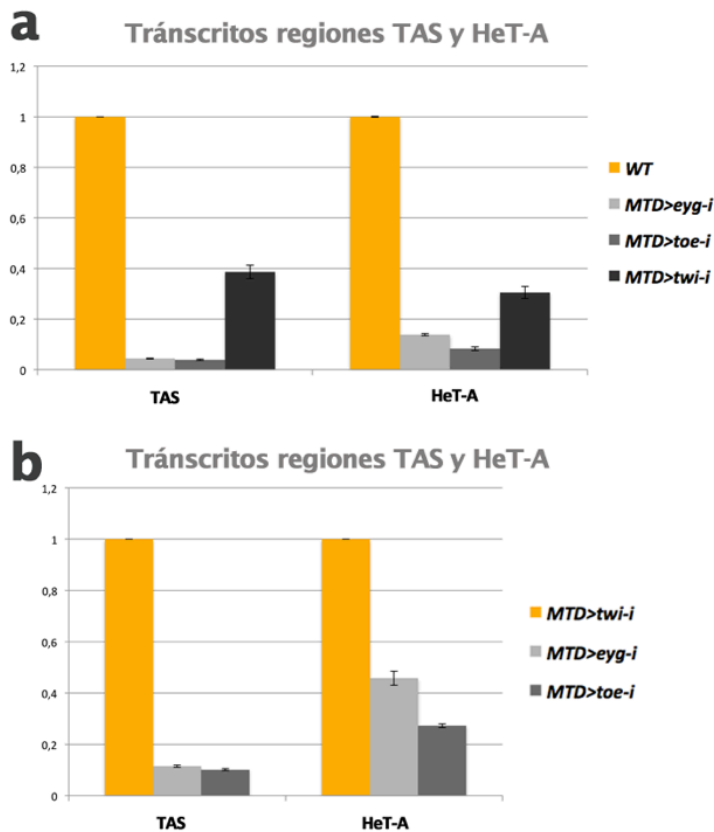


Figura R-25. Reducción en los niveles de transcripción del retrotransposon *HeT-A* y de las secuencias *TAS* en embriones con componente materno de *eyg* y *toe* reducido. (e) Gráfica que representa la abundancia de tránscrios de las regiones teloméricas *HeT-A* y *TAS* en embriones *MTD>eyg-i*, *MTD>toe-i* y *MTD>twi-i* respecto a embriones *wt*. Los embriones *eyg-i* y *toe-i* ven disminuida su cantidad de tránscrios en las regiones de ADN repetido *TAS* y en algo menos en el elemento *HeT-A*. La disminución es menos pronunciada con el uso de *twi-i*. **(f)** Gráfica que representa la abundancia de tránscrios de las regiones teloméricas *HeT-A* y *TAS* en embriones *MTD>eyg-i* y *MTD>toe-i*, respecto a los embriones *MTD>twi-i*.

La cantidad de tránscrios de secuencias *TAS* disminuye con la eliminación de *eyg* y *toe* en mayor medida que las del elemento *HeT-A*. Aún así la reducción de los tránscrios de este último supera el 50% en el caso de *eyg-i* y el 70% el de *toe-i*.

Como hemos comentado en el apartado de introducción, *D. melanogaster* carece de telomerasa y para evitar el acortamiento de los telómeros se vale de la retrotransposición de los elementos móviles de la región HTT telomérica. Esta región se encuentra influenciada por el efecto heterocromatinizador que ejerce sobre ella el dominio *TAS*. Visto que este dominio parece estar alterado de alguna manera en embriones mutantes maternos para *eyg* y *toe* quisimos analizar si la transcripción del retrotransposón más activo de los tres, *HeT-A*, se estaba produciendo correctamente. El resultado se muestra en la figura R-25; la gráfica muestra una disminución de este tráncrito usando los interferentes contra *eyg*, *toe* y *twi*, que

utilizamos como control, respecto a transcritos de embriones salvajes (Fig. R-25 a). Esta disminución es menor en el caso del interferente de *twi* que en los casos de *eyg* y *toe*. La figura R-25 (b) muestra el nivel de transcrito *HeT-A* en embriones con valores reducidos de componente materno de *eyg* y *toe* respecto a *twi*. La reducción de la cantidad de transcrito utilizando el ARN-i de *toe*, un 80% aproximadamente, es mayor que la reducción utilizando el ARN-i de *eyg*, que es casi del 60%.

Discusión

Este trabajo ha tenido como objetivo el estudio de la función de los factores de transcripción *eyg* y *toe* durante el desarrollo embrionario temprano de *Drosophila melanogaster*. Para ello hemos realizado un análisis descriptivo de la presencia de ambas proteínas tanto en el componente materno depositado durante la ovogénesis como en el blastodermo sincitial y hemos observado los fenotipos que presenta la falta cigótica y materna de ambos genes en embriones de estadios tempranos del desarrollo para después compararlos con aquellos obtenidos de organismos silvestres. Asimismo, hemos analizado el papel de *toe* independiente de *eyg* durante el desarrollo embrionario de la mosca de la fruta comparando los fenotipos que presenta la falta de función simultanea de ambos genes con aquellos que presenta la falta de función de *eyg*.

D-1. Eyg y Toe están presentes en el componente materno y en el blastodermo sincitial

La embriogénesis temprana de *Drosophila melanogaster* se produce a gran velocidad. En sus primeras dos o tres horas 13 divisiones nucleares, que están entre las más rápidas del reino animal (Foe y Alberts, 1983), distribuyen unos 6.000 núcleos en la periferia del embrión bañados por el mismo citoplasma. El ritmo y la coordinación de este proceso biológico es crucial para que el organismo se desarrolle de manera normal. Estas divisiones se producen de forma sincronizada y no se conocen muy bien los mecanismos que regulan dicha sincronización.

La formación del blastodermo sincitial se vale del componente materno depositado en el huevo durante el proceso de su formación u ovogénesis y es independiente de la información genética que contiene el cigoto (Tadros y Lipshitz, 2009). La rapidez de las divisiones nucleares, cuya duración es inferior a los 10 minutos, hace bastante improbable la existencia de expresión génica; además, la transcripción cigótica no es detectada hasta el ciclo de división número 8, cuando comienza a producirse a muy bajos niveles (Pritchard y Schubiger, 1996). Al entrar los núcleos en la interfase número 14 comienza la transición materno-cigótica en la que comienzan a detectarse altos niveles de transcripción cigótica unidos a una rápida degradación de los productos maternos (McKnight y Miller, 1976, Anderson y Lengyel, 1979, Yasuda et al., 1991, Tadros y Lipshitz, 2009). A partir de este punto las divisiones pierden su sincronía y se dividen a un ritmo mucho más lento (Foe y Alberts, 1983).

Hasta la fecha está descrito que *eyg* y *toe* comienzan a expresarse en el estadio embrionario 8-9. Esta expresión se concentra en el primordio de las glándulas salivares. Más tarde se empiezan a expresar en el primordio del disco imaginal de ojo-antena y en regiones concretas a lo largo de los segmentos embrionarios (Aldaz et al., 2003, Yao et al., 2008).

En este trabajo hemos puesto de manifiesto que ambas proteínas están presentes en el blastodermo sincitial de *Drosophila* y que su producto génico parece estar siendo depositado en el componente materno durante los primeros estadios de la ovogénesis.

En los experimentos de *western blot* (fig. R-7) observamos que existe una reducción de señal de Eyg y Toe en embriones de puestas de 1,5 horas para la deficiencia que elimina ambos

genes, *FD2*, respecto al genotipo silvestre. No existe una desaparición total de la señal proteica. Tratándose de embriones en estadio de blastodermo sincitial la transcripción cigótica es muy débil o inexistente lo que indica que la proteína observada es la depositada en el huevo durante la ovogénesis (que corresponde a la mitad de la cantidad de proteína silvestre ya que el genotipo de la progenitora es *FD2/+*). El anticuerpo α -Toe reconoce dos bandas de proteína, una de las cuales (la de menor peso molecular) presenta mayor señal en los huevos sin fecundar. Se podría tratar de una isoforma o de una modificación postraduccional de la proteína utilizada durante las primeras divisiones nucleares del blastodermo sincitial que se mantiene intacta en los huevos no fecundados.

En tinciones de ovariolas de hembras de genotipo silvestre pudimos comprobar que existe señal de los anticuerpos α -Eyg/Toe y α -Toe en los primeros estadios de la cámara del huevo, tanto en el citoplasma de células foliculares como en el citoplasma de las células nutricias. Además de estas señales citoplasmáticas cada anticuerpo presenta una señal específica. El anticuerpo α -Eyg/Toe da una tinción más concentrada alrededor de una de las células de la cámara del huevo que pudiera corresponder al oocito debido al pequeño tamaño de su núcleo en comparación con los núcleos politénicos del resto de las células nutricias de la cámara. Por otra parte, Toe parece concentrarse en las fibras musculares de la vaina epitelial que rodea cada ovariola. Estas tinciones diferenciales nos indican que ambas proteínas podrían estar jugando papeles distintos en la ovogénesis.

La hibridación *in situ* fluorescente de embriones ya segmentados homocigóticos para la doble mutación (*FD2/FD2*) muestra una señal basal de los ARNs mensajeros de *eyg* y *toe* que parece corresponder a componente materno que aún no ha sido degradado. Este dato es algo sorprendente debido al alto nivel de degradación de los productos génicos depositados de manera materna una vez una vez iniciada la transición materno-cigótica (Tadros y Lipshitz, 2009). Sin embargo, también se ha descrito que no todos los productos derivados del componente materno se degradan durante esta transición. Un ejemplo se refleja en el gen *extradenticle* cuyo componente materno, expresado uniformemente a lo largo del embrión hasta el estadio 8, es capaz de rescatar los fenotipos derivados de la falta cigótica del gen (Rauskolb et al., 1993).

También hemos observado que las proteínas Eyg y Toe están presentes en el blastodermo sincitial. Ambos anticuerpos (α -Eyg/Toe y α -Toe) ofrecen señales difusas en núcleo y citoplasma que no colocalizan y que en el caso de Toe incluye una señal más concentrada situada de manera apical a los núcleos del embrión.

El anticuerpo desarrollado en cobaya (α -Eyg/Toe) (Aldaz et al., 2003) fue generado a partir de la clonación del ADN complementario completo de *eyg*. Debido a la alta homología de secuencia entre *eyg* y *toe* (comparten un 60% de homología de secuencia) es de suponer que este anticuerpo fuera capaz de reconocer las dos proteínas. Sin embargo, no hemos encontrado colocalización alguna entre éste y el anticuerpo desarrollado contra Toe. Este último se desarrolló a partir de tres secuencias aminoacídicas susceptibles de ser fosforiladas postraduccionalmente y que sólo están presentes en Toe (ver materiales y métodos). Teniendo en cuenta la localización citoplásmica en los blastodermos sincitiales y la localización en la vaina epitelial que recubre las ovariolas de hembras silvestres es posible que este anticuerpo esté reconociendo una modificación de la proteína capaz de exportarse al citoplasma para ejercer allí otra función.

Desconocemos el papel que Eyg y Toe están jugando a nivel citoplasmático, pero lo que parece claro es que tanto en los primeros estadios de la cámara del huevo como en el blastodermo sincitial existe una expresión basal difusa de ambas proteínas en núcleo y citoplasma que se añade a la existencia de otras expresiones más específicas de las dos proteínas también citoplasmáticas como la encontrada alrededor del posible oocito en la cámara del huevo con α -Eyg/Toe y la encontrada en el blastodermo sincitial situada de manera apical al núcleo con α -Toe.

Trabajos realizados en la última década han atribuido funciones a factores de transcripción a nivel citoplasmático. Un ejemplo es el caso de Prep1, un cofactor de genes *Hox* con homeodominio que está presente en el citoplasma del oocito de ratón para regular negativamente la traducción de *Hoxb4* mediante la asociación con 4EHP (proteína homóloga al factor 4E de iniciación de la traducción eucariota) (Villaescusa et al., 2009). Además, se ha visto que pueden actuar como moléculas señalizadoras que viajan entre células. Varios ejemplos se han encontrado en el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados. Uno de ellos es Pax6 que difunde para ejercer una función no autónoma celular en el desarrollo del primordio del ojo

del pez cebra (Lesaffre et al., 2007). Otro ejemplo es Engrailed (En). Como proteína extracelular En participa en la formación del mapa topográfico del sistema de visual de vertebrados (Brunet et al., 2005, Wizenmann et al., 2009). En *Drosophila* se ha visto que En difunde extracelularmente e interacciona con la vía de señalización de Dpp para contribuir al desarrollo de la crosvena anterior del ala de la mosca (Layalle et al., 2011).

Este posible papel citoplasmático de Eyg y Toe viene apoyado por los experimentos de generación de clones de recombinación mitótica (en fondo *M/+*) que demuestran que existe una expresión en el citoplasma de las células del disco imaginal de ala. Esta expresión se da en regiones donde no hay presencia de Eyg nuclear, como es la región presuntiva del ala. Las células del clon mutantes homocigóticas para *eyg* ven reducida la señal del anticuerpo que reconoce las dos proteínas. Esta señal, que no llega a desaparecer, podría dar cuenta de la presencia de Toe, que no está siendo eliminada con esta mutación. Estas observaciones se han obtenido en unas condiciones concretas, como es el fondo heterocigótico para *Minute* (que dan una ventaja proliferativa a las células del clon respecto a las células que lo rodean), y sería interesante realizar estos experimentos en un fondo silvestre. Esta expresión da indicios y apoya un posible y sorprendente papel citoplasmático de estos factores de transcripción durante el desarrollo.

D-2. *eyg* y *toe* participan en la formación y/o mantenimiento de la heterocromatina constitutiva

Las primeras 13 divisiones que se producen en el blastodermo sincitial se producen a gran velocidad. Para que se dé este hecho las divisiones blastodérmicas han de acortar la duración de sus ciclos. Esto lo consiguen con diferentes estrategias: hasta el ciclo número 13 los ciclos carecen de fase G y alternan fase S y mitosis; en el ciclo número 14 aparece la fase G2 y no hay fase G1 hasta el ciclo 17. Además, durante las 9 primeras divisiones rápidas (una vez que los núcleos alcanzan la periferia del embrión su ritmo de división se ve ralentizado) la descondensación de la cromatina y la rotura de la membrana nuclear ocurre en telofase en

lugar de en profase, lo que sugiere un adelanto en el comienzo de la fase S (Foe, 1983). En estas divisiones prácticamente no existen mecanismos de control o *checkpoints* que impidan a los núcleos que presentan daño genético continuar dividiéndose. Por lo tanto, es posible que los núcleos continúen sus divisiones acumulando errores producidos ciclo tras ciclo (Rieder y Maiato, 2004).

En este trabajo mostramos fenotipos de embriones en estadio de blastodermo sincitial que comienzan sus divisiones blastodérmicas sin las cantidades silvestres de *eyg* y *toe*. Embriones procedentes de hembras mutantes heterocigóticas para *eyg* (*eyg*^{20MD1}) presentan fragmentaciones cromosómicas. La frecuencia con la que aparecen dichas fragmentaciones aumenta en los embriones puestos por hembras mutantes heterocigóticas para *eyg* y *toe* (*FD2*) y aún en mayor grado cuando eliminamos el componente materno de *eyg* (*eyg*^{20MD1}*mat*⁻). De la misma manera que aumenta la frecuencia de encontrar este tipo de fragmentaciones aumenta la dificultad de que los embriones que son mutantes también para el componente cigótico proveniente del componente paterno superen los sucesivos estadios de desarrollo. Es decir, es común encontrar larvas de tercer estadio de genotipo *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1}, es poco frecuente encontrar larvas de tercer estadio de genotipo *FD2*/*FD2* y es infrecuente encontrar larvas de genotipo *eyg*^{20MD1}*mat*⁻/*cig*⁻. Estos resultados indican por un lado que el componente materno de *toe* parece tener un peso específico importante, de hecho los análisis de cutículas larvarias que generan embriones *FD2*/*FD2* presentan un fenotipo más severo que las producidas por *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1}. Y por otro lado deducimos que el componente materno de *eyg* es capaz de rescatar la falta cigótica, al menos de *eyg*, permitiendo que embriones *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1} sigan su desarrollo y logren alcanzar el tercer estadio larvario. Los embriones que comienzan su desarrollo con la mitad del componente materno de *eyg* y aquellos que lo hacen con la mitad de componente materno de *eyg* y *toe* (*eyg*^{20MD1} y *FD2* respectivamente) ya sufren fragmentaciones cromosómicas durante sus divisiones mitóticas. Este hecho indica que la falta de una dosis de componente materno es suficiente para producir fallos en las segregaciones cromosómicas.

La existencia de las fragmentaciones cromosómicas sugiere que los núcleos pueden estar teniendo dificultades para completar cada ciclo mitótico y como consecuencia están perdiendo material genético durante sus divisiones. Es curioso el hecho de que somos capaces de visualizar siempre las proteínas *Eyg* y *Toe* presentes en los citoplasmas de las células de la

cámara del huevo y del blastodermo sincitial adheridas a los fragmentos cromosómicos presentes alrededor de los núcleos. Asumimos que esto es así porque se trata de pedazos de ADN desnudo, es decir carentes de envoltura nuclear, rodeados de citoplasma donde están presentes estos factores de transcripción con alta afinidad a ADN.

Las fragmentaciones parecen indicar que regiones cromosómicas cuya estructura es clave a la hora de completar las divisiones no están construyéndose de manera correcta en ausencia de cantidades silvestres de *eyg* y *toe*. Estas regiones son los telómeros y centrómeros. El hecho de que ambas proteínas se encuentren localizadas en telómeros y cromocentro (región análoga al centrómero) de cromosomas politénicos de glándulas salivares da fuerza a la hipótesis de que ejerzan ahí una función.

D-2.1 *Eyg* y *Toe* participan en el ensamblaje de los centrómeros

Los centrómeros se visualizan citológicamente como una constricción primaria en los cromosomas metafásicos y son regiones esenciales para que se produzca el reparto cromosómico apropiado. Defectos en la función del centrómero están asociados a aneuploidías y defectos congénitos (Dobie et al., 1999). La función centromérica requiere la coordinación de diversos procesos como el ensamblaje del cinetocoro, la cohesión de cromátidas hermanas, el anclaje del huso mitótico y el movimiento de los cromosomas. En organismos eucariotas los centrómeros se encuentran embebidos en regiones heterocromáticas muy ricas en ADN repetido que están asociadas al cinetocoro. Este complejo formado por ADN y proteínas es el responsable del anclaje de los microtúbulos del huso mitótico, de la congregación de la metafase, del inicio de la anafase y del movimiento hacia los polos (Dobie et al., 1999).

Las regiones heterocromáticas de *Drosophila* que constituyen el centrómero se caracterizan por presentar la variante epigenética de la histona H3 conocida como CID (*Centromere Identifier Protein*). La presencia de esta proteína es requerida para la función y localización normal del cinetocoro y para la progresión del ciclo celular. El centrómero está rodeado de

heterocromatina pericentromérica donde se localizan otras proteínas como Mei-S322, HP1 o POLO (Blower y Karpen, 2001). La localización correcta de estas proteínas depende de la presencia funcional de CID, sin embargo, las condiciones mutantes de Mei-S322, HP1 o POLO no producen fallos de localización de CID. Este hecho sugiere que la proteína CID es epistática sobre el resto de componentes proteicos del centrómero (Blower y Karpen, 2001).

En este trabajo hemos demostrado que la falta de componente materno de *eyg* produce una localización anormal de la proteína CID que en ocasiones aparece difusa o incluso ausente. Este fenotipo indica que la función de *eyg* en centrómeros podría tener un carácter general ya que la marca epigenética característica de estas regiones se está viendo alterada.

Además de los fenotipos de fragmentaciones cromosómicas, hemos observado que los embriones mutantes maternos para *eyg* presentan figuras mitóticas aberrantes como puentes anafásicos y lo que parecen ser repartos desiguales postmitóticos de material genético. Estos hechos parecen repetirse en los análisis de las figuras cromosómicas de células del sistema nervioso central de larvas mutantes homocigóticas para *eyg*, en los cuales también aparecen figuras cromosómicas aberrantes.

El análisis *in vivo* del blastodermo sincitial *FD2* mostró una falta de sincronía en las divisiones de los núcleos del embrión que ocurre con mayor frecuencia cuando reducimos el componente materno de *eyg*. Esta asincronía fue confirmada con la tinción contra Ph3 que marca los núcleos en mitosis. Mientras que en embriones silvestres la tinción es homogénea en todos los núcleos, los embriones *eyg*^{20MD1}*mat*⁻ pierden esta homogeneidad en la tinción y presentan diferentes grupos de núcleos teñidos en función de la fase del ciclo mitótico en la que se encuentren o sin llegar a teñirse si el núcleo es interfásico. Se ha estudiado que fallos de función del citoesqueleto a nivel de centrosoma pueden provocar puentes anafásicos. Estos errores acarrearán la generación de fragmentaciones cromosómicas y la salida del ciclo mitótico y como consecuencia los núcleos acaban por hundirse en el citoplasma común (Sakurai et al., 2011). La disposición de los núcleos en la corteza del embrión deja de ser equidistante en ausencia de componente materno de *eyg* y en ocasiones existen regiones más o menos extensas en las que no se observa la presencia de ningún núcleo. La existencia de grupos de centrosomas huérfanos parece indicar que aquellos núcleos que sufren fallos durante sus divisiones salen del ciclo mitótico y como consecuencia se hunden hacia el interior del embrión.

Este hecho daría origen a estas regiones desprovistas de núcleos y a falta de equidistancia entre los núcleos presentes.

El conjunto de fenotipos descritos para embriones carentes de *eyg* materno recuerda a los producidos por la falta de función de CID, que también genera errores en la sincronización de los núcleos en división (Blower y Karpen, 2001). En las primeras horas del desarrollo embrionario de *Drosophila* no existe funcionamiento del mecanismo de control de activación del huso mitótico (*spindle checkpoint*) que impide la entrada en anafase hasta que los cinetocoros de cromátidas hermanas se han ensamblado correctamente a los microtúbulos del huso acromático, además las primeras divisiones rápidas carecen de fase G2 y no hay mecanismos de detección de errores de segregación cromosómica (Cleveland et al., 2003, Rieder y Maiato, 2004). La inactivación de estos mecanismos de control parece no estar impidiendo el avance de las divisiones blastodérmicas aunque los fallos en la formación de los centrómeros pueden estar retrasándolas y haciendo que se produzcan de manera incorrecta. De esta manera se generan asincronías en las divisiones, defectos en la segregación mitótica y fragmentaciones cromosómicas.

La fosforilación de la variante de la His2Av en el residuo serina 137 supone una señal específica de rotura de doble cadena de ADN (Redon et al., 2002). Debido a la ausencia de los mecanismos de control mencionados anteriormente en las primeras divisiones embrionarias los núcleos de embriones de genotipo silvestre teñidos con el anticuerpo que marca esta modificación de la histona 2A presentan un punteado que indica la existencia de ciertos errores mitóticos que se producen de manera normal. Esta señal se ve intensificada en los núcleos de embriones carentes de componente materno de *eyg* lo que sugiere la existencia de un mayor número de roturas de doble cadena que podrían acarrear inestabilidad genómica.

Cuando observamos embriones *eyg*^{20MD1}*mat*⁻ ya celularizados, estas asincronías en las divisiones nucleares resultan en embriones con fenotipos que podríamos agrupar en dos tipos:

- Por un lado están los embriones representados por la figura R-15 (d-f) en los que parece que los núcleos van perdiendo sucesivamente su sincronización respecto a los otros y acaban generando embriones en el que existen multitud de grupos de núcleos en estadios diferentes del ciclo mitótico-interfásico.

- Y por otra parte están aquellos en los que existen dos grupos de células. En ellos a su vez podemos distinguir aquellos en los que muy temprano en el desarrollo, cuando el número de núcleos es muy bajo, se produce la asincronía de sus divisiones para que después los núcleos resultantes continúen el resto de las divisiones sin que se produzcan más asincronías generándose de esta forma embriones en los que parecen existir únicamente dos poblaciones de diferente tamaño nuclear en todo el embrión. Este tipo queda representado por los embriones presentes en la figura R-16 (a y c) y R-17 (i-l). O bien aquellos embriones en los que en los últimos ciclos de división de los 13 que se producen en el blastodermo sincitial se produce una asincronía que acaba resultando en un parche formado por un pequeño número de células que difiere del resto, representados en la figura R-16 (b).

En este caso las poblaciones de células se disponen de diferente manera en la superficie de la corteza del embrión, siendo una población más apical a la otra; esto podría deberse al hecho de que cada población se encuentra en diferente fase del ciclo mitótico y los núcleos cambian su posición dentro de la célula a una posición más apical a la hora de entrar en mitosis.

La tinción con faloidina de la F-actina de las membranas plasmáticas de embriones *eyg*^{20MD1}*mat*⁻ celularizados parecen indicar que esta celularización, al igual que en organismos silvestres, comienza a producirse una vez que los núcleos terminan su ciclo número 13. Ahora bien, si observamos la figura R-17 (e-i), alrededor de cada núcleo se crea una membrana plasmática cuyo diámetro va en proporción del tamaño nuclear; por lo tanto aquellos núcleos de menor tamaño y que parecen haber sufrido un ciclo menos de división son celularizados a la vez que el resto, aunque no hayan alcanzado el ciclo mitótico número 13. En cualquier caso la tinción con faloidina muestra que esta celularización parece producirse *a priori* de manera normal, aunque sería necesario realizar un análisis más exhaustivo de la distribución de los componentes citoesqueléticos que componen la membrana plasmática.

R-2.2 Transcripción de secuencias de ADN satélite

En los últimos años se ha demostrado que la heterocromatina constitutiva no es transcripcionalmente inactiva. Estas regiones se transcriben en ARNs no codificantes que

juegan un importante papel en la formación y mantenimiento de la misma (Lu y Gilbert, 2007, Probst et al., 2010). En este trabajo hemos analizado el nivel de transcritos de secuencias de ADN satélite centroméricas y pericentroméricas que se sabe que son procesados por la maquinaria del ARN-i en *Drosophila* (Usakin et al., 2007). La cantidad de transcritos de la región centromérica 359-pb y de las regiones pericentroméricas 260-pb y 361-pb se ven muy disminuidos cuando reducimos los niveles maternos de *eyg* y *toe*. Esta disminución es mayor en el caso de reducir el componente materno de *toe* (ver más adelante). No parece haber un comportamiento diferencial entre las regiones pericentroméricas y la región centromérica. En este análisis utilizamos el ARN-sh contra el factor de transcripción *twi* como control negativo; es sorprendente el hecho de que también exista reducción, si bien es cierto que ésta se da en menor medida, de los niveles de transcritos de las secuencias al reducir el componente materno de este gen. Una posibilidad es que este factor de transcripción también esté implicado de alguna manera en la regulación de la transcripción de estas secuencias y otra posibilidad recae en el hecho de que la técnica empleada en sí tenga algún efecto interferente en el procesamiento de dichos transcritos, que se sabe que son procesados por la maquinaria del ARN-i (podríamos estar alterando alguno de los componentes de esta maquinaria y produciendo así una reducción basal de los transcritos debida al uso en sí de la técnica). En cualquier caso el experimento demuestra una reducción específica bastante mayor en los niveles de transcritos de estas regiones de ADN satélites debida a la ausencia de componente materno de *eyg* y *toe* que la producida por la ausencia de componente materno de *twi*.

En levaduras se ha visto que ARNs no codificantes procedentes de la transcripción de regiones satélite centroméricas son procesados por la maquinaria del ARN-i. Este hecho resulta necesario para que se produzca el correcto ensamblaje de la heterocromatina centromérica y para el correcto funcionamiento del centrómero (Volpe et al., 2002, Volpe et al., 2003, Verdel et al., 2004, Kato et al., 2005).

En *Drosophila* se ha descrito que la maquinaria del ARN-i está implicada en la formación del centrómero ya que embriones mutantes para genes que codifican proteínas de dicha maquinaria como *argonaute-2* (*ago-2*) presentan fenotipos como fragmentaciones de material genético, defectos mitóticos, reparto desigual cromosómico y asincronía en las divisiones blastodérmicas. Estos mutantes, además, presentan alterada la localización de proteínas centroméricas y pericentroméricas como CID y HP1 respectivamente (Deshpande et al., 2005).

Otros estudios demostraron que mutaciones en el gen de *Drosophila dfmr1* (*frágil X mental retardation gene*) también resultan en ciclos de división defectuosos en el embrión temprano. En ellos se observan fenotipos como asincronía en las divisiones nucleares, figuras mitóticas con cromosomas no condensados completamente y fragmentaciones cromosómicas (Deshpande et al., 2006). Tanto *ago-2* como *dfmr1* son requeridos para el silenciamiento heterocromático temprano ya que ambos se comportan como supresores de la variegación (Deshpande et al., 2005, Deshpande et al., 2006). Está descrito que funciona como cofactor de la maquinaria del ARN-i y se asocia físicamente con Ago-2 y otros componentes de la vía (Ishizuka et al., 2002).

En 2009 se describió por primera vez que la falta materna de un factor de transcripción como *homothorax* (*hth*) genera divisiones blastodérmicas defectivas que se manifiestan con fragmentaciones cromosómicas y deslocalización de la marca centromérica CID. Los autores observaron que *hth* colocaliza en los núcleos sincitiales con la ARN-polimerasa II y que en ausencia de componente materno de este factor de transcripción se produce una reducción de la cantidad de transcritos de la región de ADN satélite centromérica *359-pb*. Estos hechos demostraron por primera vez en *Drosophila* que es necesaria la transcripción de este tipo de secuencias para que se produzca un correcto ensamblaje de los centrómeros (Salvany et al., 2009).

En 2012, se publicó el papel que juegan los factores de transcripción Pax3 y Pax9 como reguladores redundantes de la formación de heterocromatina en ratón. Su falta de función produce una desrepresión de las secuencias satélites pericentroméricas, la pérdida de marcas heterocromáticas y defectos en la segregación cromosómica (Bulut-Karslioglu et al., 2012).

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que *eyg* reprime a *wg*, uno de sus genes diana en el desarrollo del ojo, mediante silenciamiento génico por heterocromatinización. Además observamos que *eyg* se comporta como un supresor de la variegación e interacciona física y genéticamente con HP1a para realizar su función represora (Salvany et al., 2012). Datos no publicados aún por nuestro laboratorio, ponen de manifiesto que en condiciones mutantes *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1} regiones heterocromáticas como *H23*, *1360* y la región de *ARN ribosómico* son más sensibles a la digestión por la exonucleasa DNasa I. Esta mayor sensibilidad se debe a que estas regiones pierden la conformación cerrada heterocromática que en condiciones

silvestres les protege del ataque de esta encima. El conjunto de estos hechos junto con los resultados presentados en este trabajo reflejan una relación de *Eyg* (y probablemente de *Toe*) con la formación general de heterocromatina ya sea facultativa o constitutiva. Por una parte, *eyg* parece tener un papel en la formación de heterocromatina facultativa como silenciador génico y para llevarlo a cabo interacciona con HP1a. Y por otra parte, *eyg* y *toe* están participando de manera activa en la transcripción de las regiones de ADN satélite centroméricas y pericentroméricas cuyos productos podrían interaccionar con y ser procesados por la maquinaria del ARN-i para servir de guía a la maquinaria de modificación de la cromatina (histonas deacetilasas y metil-transferasas) y ensamblar así de manera correcta los centrómeros.

R-2.3 *Eyg* y *Toe* participan en el ensamblaje de los telómeros

Los telómeros son estructuras muy especializadas formadas por ADN y proteínas que protegen y estabilizan el final linear de los cromosomas. Fallos en la función telomérica acaban acarreado problemas de inestabilidad cromosómica. Estos procesos provocan cambios en la dosis génica producidos por aberraciones cromosómicas tanto estructurales como numéricas que se dan durante la proliferación celular (Lengauer et al., 1998). Defectos de este tipo están presentes en varias enfermedades como el cáncer (Ried et al., 1999, Weiss et al., 2003).

Junto con los centrómeros los telómeros son regiones estructuralmente clave para la correcta segregación cromosómica. En este trabajo hemos visto que *Eyg* y *Toe* están presentes en regiones formadas por heterocromatina constitutiva como el cromocentro y los telómeros de los cromosomas politénicos.

En *Drosophila* el acortamiento de los telómeros se resuelve mediante la transposición dirigida de tres retrotransposones de tipo no-LTR: *HeT-A*, *TART* y *TARE*. Su transcripción genera ARNs mensajeros que son traducidos a proteínas estructurales GAG y a retro-transcriptasas. Las proteínas GAG facilitan el retorno al núcleo del ARN mensajero que se acopla al final del cromosoma y es transcrito de manera inversa por la retro-transcriptasa (Mason et al., 2008).

Los telómeros en *Drosophila* se dividen en tres dominios: el dominio más terminal es el dominio *cap* telomérico, a continuación se encuentra el dominio HTT que contiene los tres retrotransposones repetidos en tándem y más allá hacia el centrómero están las secuencias repetidas TAS (Mason et al., 2008). Estas secuencias ejercen un efecto heterocromatinizador que va hacia la región más terminal, lo que conlleva que el dominio HTT se encuentre influenciado por ellas.

Las figuras cromosómicas obtenidas de células del sistema nervioso central de larvas *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1}, aunque son aberrantes, no muestran fusiones con las que permanezcan unidos los cromosomas homólogos lo que sugiere que *eyg* no estaría formando parte del *capping* telomérico pero sí pudiera estar participando en la correcta estructuración de los telómeros.

En este trabajo hemos visto cómo afecta la reducción de una dosis de *eyg* a la expresión en el ojo de un transgen *white* insertado entre los dominios TAS y HTT del telómero. En condiciones silvestres este gen se encuentra silenciado debido al efecto heterocromatinizador que ejerce sobre él la región TAS (efecto de posición telomérica) y se ve desreprimido en condiciones heterocigóticas para *eyg*. Este hecho sugiere que la conformación heterocromática del telómero se puede estar viendo comprometida en ausencia de *eyg* y que *Eyg* funciona como un supresor del efecto de posición telomérica. Esta pérdida de conformación heterocromática puede ser debida a la reducción de los niveles de transcritos de las secuencias TAS cuya transcripción parece producirse y podría ser necesaria para que se dé el correcto ensamblaje de este dominio. Es lógico pensar que los transcritos producidos en dicha transcripción pudieran estar siendo procesados por la maquinaria del ARN-i de la misma manera que ocurre en la región centromérica.

Los embriones que carecen de componente materno de *eyg* y *toe* ven reducidos los niveles de transcrito del retrotransposón más activo del dominio HTT: *HeT-A*. Este resultado no deja de ser sorprendente ya que el hecho de que *eyg* se comporte como un supresor del efecto de posición telomérica haría esperar que su falta de función provocara un aumento de la transcripción de estas regiones. Este resultado nos indica que *Eyg* (y *Toe*) pudieran estar jugando un doble papel en la región telomérica. Por una parte funcionaría como componente de la maquinaria modificadora de la cromatina, quizás interaccionando con HP1a (como lo

hace en el caso de la represión de *wg* durante el desarrollo del ojo) y mantendría así el estado heterocromático de la región y por otro lado pudiera tener un papel parecido al que parece tener en el centrómero colaborando como factor de transcripción que es en la transcripción de este tipo de secuencias. Otra opción podría recaer en que el hecho de verse comprometida la estructura heterocromática de la región TAS en ausencia, al menos, de *eyg* ésta estuviera alterando el equilibrio epigenético que ha de mantener la región HTT entre el estado cerrado y heterocromático como componente telomérico que es y el estado cromatínico abierto para generar los transcritos de los retrotransposones que mantienen la longitud del telómero. Sería interesante analizar los niveles de transcripción del resto de componentes del dominio HTT: *TART* y *TARHE*.

Vistos los cambios producidos en los niveles de transcripción de uno de los retrotransposones que evitan el acortamiento telomérico en ausencia de componente materno de *eyg* y *toe* sería muy interesante investigar si ambos genes pudieran estar participando en la regulación de la longitud del telómero. Se ha visto que HP1, además de participar en el *capping* telomérico también está implicada como represora en el control de la transcripción de transposones y de la longitud del telómero (Savitsky et al., 2002). Estas funciones las realiza mediante diferentes tipos de unión al telómero. Para realizar su función en el dominio *capping* telomérico se une directamente a la región telomérica mientras que la función represiva la realiza a través de la interacción con el residuo H3K9 trimetilado (Perrini et al., 2004).

Eyg y *Toe* podrían estar realizando una doble función en el telómero: por una parte participarían en el mantenimiento de la estructura heterocromática de la región telomérica, quizás a través de su interacción con HP1 (por demostrar en el caso de *Toe*) y por otra parte ayudarían como factores de transcripción a transcribir regiones importantes como las regiones TAS y *HeT-A* colaborando con las ARN polimerasas.

Una vez más, hemos visto que al utilizar un ARN-i control como el del factor de transcripción *twi* también se produce una reducción de los transcritos tanto del retrotransposón *HeT-A* como de las secuencias TAS. Más allá de que la reducción del componente materno de *twi* pudiera tener un efecto en la transcripción de estas regiones teloméricas o que la técnica empleada pudiera estar interfiriendo al procesamiento de los transcritos el experimento demuestra una reducción específica bastante mayor en los niveles de transcritos de estas

regiones debida a la ausencia de componente materno de *eyg* y *toe* que la producida por la ausencia de componente materno de *twi*.

R-3. *eyg* y *toe* ejercen papeles no redundantes durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*

eyg y *toe* se localizan de manera adyacente en el brazo izquierdo del cromosoma 3. Ambos comparten un 60% de secuencia por lo que se cree que son producto de una duplicación ancestral. Su patrón de expresión es solapante excepto en determinados órganos durante el desarrollo embrionario tardío aunque los niveles de expresión de *toe* son más bajos que los de *eyg* (Yao et al., 2008). Se ha descrito que la sobreexpresión de Toe es capaz de rescatar parcialmente la falta de función de *eyg* y que su falta de función utilizando ARNs interferentes contra su mensajero no genera fenotipo por sí sola (Aldaz et al., 2003). Hasta la fecha se piensa que ambos genes ejercen funciones redundantes y que es *eyg* el que lleva el peso de la pareja.

En este trabajo hemos demostrado que existe una expresión diferencial de ambos genes durante la ovogénesis y el desarrollo embrionario temprano de *Drosophila* lo que indica que puedan existir funciones diferentes para cada uno de ellos en estos estadios.

Cuando utilizamos los ARN-sh para reducir el componente materno mediante el sistema *Mat-Gal4/UAS-ARN-i* de cada gen observamos que cada ARN-sh independientemente produce la regulación negativa de los dos genes. Esto se puede deber a la alta homología de secuencia que comparten y por la cual el ARN-sh puede estar reconociendo ambos mensajeros y uniéndose a ellos para degradarlos. Si observamos la figura R-20 (d) los ARN-sh contra *eyg* y contra *toe* producen una reducción similar de ambos transcritos. Sin embargo, al analizar la cantidad de transcritos de secuencias de ADN satélite centroméricas y pericentroméricas la cantidad de Eyg residual en el componente materno es capaz de generar mayor cantidad de transcritos, sobre todo de 260-pb y 359-pb, que la cantidad de Toe residual. Lo mismo ocurre

en el caso del retrotransposón *Het-A*. Estos resultados indican que *eyg* lleva un mayor peso en la transcripción de estas regiones durante el desarrollo embrionario temprano.

Existe la posibilidad de que exista una regulación cruzada entre ellos. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que larvas mutantes homocigóticas para un alelo nulo de *eyg* como *eyg*^{20MD1} presentan niveles elevados de transcrito *toe* que pudieran estar compensando la falta de dosis doble de su compañero *eyg*.

Al generar la cepa doble mutante para *eyg* y *toe* *FD2* pudimos comprobar que los fenotipos se agravaban respecto a los mutantes sencillos para *eyg*. Como hemos comentado con anterioridad, los embriones en estadio de blastodermo sincitial de genotipo *FD2* presentan frecuentemente fragmentaciones cromosómicas alrededor de los núcleos y asincronía en sus divisiones; hechos estos de menor frecuencia en embriones de genotipo *eyg*^{20MD1}. Las cutículas larvianas secretadas por embriones *FD2/FD2* tienen mayor fenotipo que las *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1} y éstas a su vez que las silvestres. Algo parecido ocurre con las glándulas salivares de larvas de tercer estadio. Las glándulas de larvas de genotipo *eyg*^{20MD1}/+ (no mostrado en este trabajo) presentan un fenotipo similar al silvestre, las glándulas de genotipo *FD2*/+ (no mostrado en este trabajo) presentan un fenotipo similar al de glándulas *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1} mientras que las glándulas de genotipo *FD2/FD2* tienen un fenotipo mucho más agravado. Por otro lado, las larvas *FD2/FD2* presentan un menor porcentaje de viabilidad que el que presentan las larvas mutantes homocigóticas sólo para *eyg*. De estas últimas prácticamente la totalidad de larvas homocigóticas logra alcanzar el estadio pupal, aunque luego perezcan en el pupario. Sin embargo, es muy poco frecuente encontrar larvas de tercer estadio homocigóticas para la doble mutación.

Al realizar clones de recombinación mitótica mutantes sencillos para *eyg* y mutantes dobles para *eyg* y *toe* en discos imaginales de larvas de tercer estadio observamos que los clones mutantes para *eyg* son capaces de sobrevivir, si bien es cierto que la morfología de los clones indica que existen problemas de integración en el tejido por falta de afinidad entre células del clon y las de alrededor. Sin embargo, los clones de células homocigóticas *FD2* no sobreviven y pudieran estar muriendo. Esta muerte podría deberse a la presencia del fenómeno de competición celular, mediante el cual el enfrentamiento de dos tipos celulares viables (las

larvas homocigóticas *FD2/FD2* logran alcanzar el tercer estadio larvario) acaba produciendo la muerte por apoptosis de uno de ellos (Morata y Ripoll, 1975, Morata y Martin, 2007).

El conjunto de estos hechos sugiere que ambos genes colaboran a la hora de realizar sus funciones con un peso específico similar siendo *toe* capaz de rescatar la falta de *eyg*.

Los fenotipos observados en las glándulas salivares parecen ser generados por fallos en el citoesqueleto de las células secretoras. De hecho, el epitelio de las glándulas *FD2/FD2* resulta muy frágil al disectar estos órganos y normalmente la pared formada por estas células acaba venciéndose hacia el lumen. Desconocemos si estos problemas en el citoesqueleto son independientes o consecuencia del aspecto que presentan los núcleos politénicos de las células secretoras al reducir dosis de *eyg* y *toe*. En ellos observamos que se pierde el patrón de alternancia de bandas eucromáticas/heterocromáticas. Además, son extremadamente frágiles lo que hace muy difícil la obtención de preparaciones de cromosomas politénicos.

C Conclusiones

1. *eyg* y *toe* son depositados en el componente materno. Se expresan en el citoplasma de las células foliculares y nutricias de la cámara del huevo durante la ovogénesis y están presentes en núcleo y citoplasma del blastodermo sincitial.
2. *eyg* y *toe* se expresan en las regiones heterocromáticas de cromosomas politénicos: el cromocentro (análogo al centrómero de cromosomas mitóticos) y telómeros.
3. La reducción de *eyg* y *toe* produce fragmentaciones cromosómicas alrededor de los núcleos del blastodermo sincitial.
4. La falta de componente materno de *eyg* y *toe* genera fragmentaciones cromosómicas, daño genético en forma de roturas de ADN de doble cadena, fallos en la segregación mitótica, figuras cromosómicas aberrantes y asincronía en las divisiones de embriones en estadio de blastodermo sincitial.
5. Los embriones carentes de componente materno de *eyg* y *toe* presentan deslocalizada la señal de la proteína centromérica CID indicando que en estas circunstancias el centrómero no se ensambla correctamente.
6. La reducción del componente materno de *eyg* y *toe* genera la disminución de transcritos de la región de ADN satélite centromérica 359-pb y las regiones de ADN satélite pericentroméricas 260-pb y 361-pb.
7. *eyg* se comporta como un supresor del efecto de posición telomérica.
8. La reducción del componente materno de *eyg* y *toe* genera la disminución de transcritos de regiones satélites teloméricas TAS.

9. La reducción del componente materno de *eyg* y *toe* genera la disminución de la transcripción de *HeT-A*, uno de los retrotransposones encargado de mantener la longitud del telómero en *Drosophila*.
10. *toe* es capaz de rescatar la falta de función de *eyg* durante el desarrollo. Ambos genes parecen colaborar en el desarrollo de estructuras como las glándulas salivares.

Bibliografía

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., . . . Venter, J. C.** (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. **287**, 2185-2195
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter, P.** (2007). Molecular Biology of the Cell. Garland Science Textbooks
- Aldaz, S., Morata, G. y Azpiazu, N.** (2003). The Pax-homeobox gene *eyegone* is involved in the subdivision of the thorax of *Drosophila*. *Development*. **130**, 4473-4482
- Anderson, K. V. y Lengyel, J. A.** (1979). Rates of synthesis of major classes of RNA in *Drosophila* embryos. *Dev Biol*. **70**, 217-231
- Andrew, D. J., Henderson, K. D. y Sessaiah, P.** (2000). Salivary gland development in *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev*. **92**, 5-17
- Avner, P. y Heard, E.** (2001). X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet*. **2**, 59-67
- Bannister, A. J. y Kouzarides, T.** (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. **21**, 381-395
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C. y Kouzarides, T.** (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*. **410**, 120-124
- Bernard, P., Maure, J. F., Partridge, J. F., Genier, S., Javerzat, J. P. y Allshire, R. C.** (2001). Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*. **294**, 2539-2542
- Bi, X., Srikanta, D., Fanti, L., Pimpinelli, S., Badugu, R., Kellum, R. y Rong, Y. S.** (2005). *Drosophila* ATM and ATR checkpoint kinases control partially redundant pathways for telomere maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**, 15167-15172
- Blower, M. D. y Karpen, G. H.** (2001). The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol*. **3**, 730-739
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**, 248-254
- Brand, A. H. y Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. **118**, 401-415
- Brasher, S. V., Smith, B. O., Fogh, R. H., Nietlispach, D., Thiru, A., Nielsen, P. R., . . . Laue, E. D.** (2000). The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *EMBO J*. **19**, 1587-1597

- Brunet, I., Weinl, C., Piper, M., Trembleau, A., Volovitch, M., Harris, W., . . . Holt, C.** (2005). The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature*. **438**, 94-98
- Bulut-Karslioglu, A., Perrera, V., Scaranaro, M., de la Rosa-Velazquez, I. A., van de Nobelen, S., Shukeir, N., . . . Jenuwein, T.** (2012). A transcription factor-based mechanism for mouse heterochromatin formation. *Nat Struct Mol Biol*. **19**, 1023-1030
- Cam, H. P., Sugiyama, T., Chen, E. S., Chen, X., FitzGerald, P. C. y Grewal, S. I.** (2005). Comprehensive analysis of heterochromatin- and RNAi-mediated epigenetic control of the fission yeast genome. *Nat Genet*. **37**, 809-819
- Cavalli, G.** (2002). Chromatin as a eukaryotic template of genetic information. *Curr Opin Cell Biol*. **14**, 269-278
- Cenci, G., Rawson, R. B., Belloni, G., Castrillon, D. H., Tudor, M., Petrucci, R., . . . Gatti, M.** (1997). UbcD1, a Drosophila ubiquitin-conjugating enzyme required for proper telomere behavior. *Genes Dev*. **11**, 863-875
- Chou, T. B., Noll, E. y Perrimon, N.** (1993). Autosomal P[ovoD1] dominant female-sterile insertions in Drosophila and their use in generating germ-line chimeras. *Development*. **119**, 1359-1369
- Chou, T. B. y Perrimon, N.** (1996). The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in Drosophila melanogaster. *Genetics*. **144**, 1673-1679
- Cleveland, D. W., Mao, Y. y Sullivan, K. F.** (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell*. **112**, 407-421
- Cohen, D. E. y Lee, J. T.** (2002). X-chromosome inactivation and the search for chromosome-wide silencers. *Curr Opin Genet Dev*. **12**, 219-224
- Cowieson, N. P., Partridge, J. F., Allshire, R. C. y McLaughlin, P. J.** (2000). Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Curr Biol*. **10**, 517-525
- Deshpande, G., Calhoun, G. y Schedl, P.** (2005). Drosophila argonaute-2 is required early in embryogenesis for the assembly of centric/centromeric heterochromatin, nuclear division, nuclear migration, and germ-cell formation. *Genes Dev*. **19**, 1680-1685
- Deshpande, G., Calhoun, G. y Schedl, P.** (2006). The drosophila fragile X protein dFMR1 is required during early embryogenesis for pole cell formation and rapid nuclear division cycles. *Genetics*. **174**, 1287-1298

- Djupedal, I., Portoso, M., Spahr, H., Bonilla, C., Gustafsson, C. M., Allshire, R. C. y Ekwall, K.** (2005). RNA Pol II subunit Rpb7 promotes centromeric transcription and RNAi-directed chromatin silencing. *Genes Dev.* **19**, 2301-2306
- Dobie, K. W., Hari, K. L., Maggert, K. A. y Karpen, G. H.** (1999). Centromere proteins and chromosome inheritance: a complex affair. *Curr Opin Genet Dev.* **9**, 206-217
- Dominguez, M., Ferres-Marco, D., Gutierrez-Avino, F. J., Speicher, S. A. y Beneyto, M.** (2004). Growth and specification of the eye are controlled independently by Eyegone and Eyeless in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet.* **36**, 31-39
- Ebert, A., Lein, S., Schotta, G. y Reuter, G.** (2006). Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromosome Res.* **14**, 377-392
- Ekwall, K.** (2007). 'Arc' escorts siRNAs in heterochromatin assembly. *Nat Struct Mol Biol.* **14**, 178-179
- Elgin, S. C.** (1996). Heterochromatin and gene regulation in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev.* **6**, 193-202
- Foe, V. E. y Alberts, B. M.** (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Sci.* **61**, 31-70
- Foe, V. E., Garrett, M., Odell, M. and Edgar, B. A.** (1983). Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo: point and counterpoint. In *The development of Drosophila melanogaster*, vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. I, 149-300
- Folco, H. D., Pidoux, A. L., Urano, T. y Allshire, R. C.** (2008). Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science.* **319**, 94-97
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., . . . Esteller, M.** (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 10604-10609
- Fujiwara, H., Osanai, M., Matsumoto, T. y Kojima, K. K.** (2005). Telomere-specific non-LTR retrotransposons and telomere maintenance in the silkworm, *Bombyx mori*. *Chromosome Res.* **13**, 455-467
- Gehring, W. J. y Ikeo, K.** (1999). Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* **15**, 371-377
- Gilbert, S. F.** (2003). *Developmental Biology*. Loosleaf

Golubovsky, M. D., Konev, A. Y., Walter, M. F., Biessmann, H. y Mason, J. M. (2001). Terminal retrotransposons activate a subtelomeric white transgene at the 2L telomere in *Drosophila*. *Genetics*. **158**, 1111-1123

Grewal, S. I., Bonaduce, M. J. y Klar, A. J. (1998). Histone deacetylase homologs regulate epigenetic inheritance of transcriptional silencing and chromosome segregation in fission yeast. *Genetics*. **150**, 563-576

Grewal, S. I. y Elgin, S. C. (2007). Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature*. **447**, 399-406

Grewal, S. I. y Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*. **8**, 35-46

Grunstein, M. (1998). Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell*. **93**, 325-328

Hall, I. M., Shankaranarayana, G. D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A. y Grewal, S. I. (2002). Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science*. **297**, 2232-2237

Holliday, R. (1987). The inheritance of epigenetic defects. *Science*. **238**, 163-170

Huisinga, K. L., Brower-Toland, B. y Elgin, S. C. (2006). The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma*. **115**, 110-122

Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout, W. M., 3rd, Biniszkiewicz, D., . . . Jaenisch, R. (2001). Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*. **293**, 95-97

Ishizuka, A., Siomi, M. C. y Siomi, H. (2002). A *Drosophila* fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev*. **16**, 2497-2508

Jenuwein, T. y Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*. **293**, 1074-1080

Jones, N. A., Kuo, Y. M., Sun, Y. H. y Beckendorf, S. K. (1998a). The *Drosophila* Pax gene eye gone is required for embryonic salivary duct development. *Development*. **125**, 4163-4174

Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., . . . Wolffe, A. P. (1998b). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*. **19**, 187-191

Jun, S., Wallen, R. V., Goriely, A., Kalionis, B. y Desplan, C. (1998). Lune/eye gone, a Pax-like protein, uses a partial paired domain and a homeodomain for DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 13720-13725

Kato, H., Goto, D. B., Martienssen, R. A., Urano, T., Furukawa, K. y Murakami, Y. (2005). RNA polymerase II is required for RNAi-dependent heterochromatin assembly. *Science*. **309**, 467-469

- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. y Jenuwein, T.** (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*. **410**, 116-120
- Lawrence, P.** (1992). *The Making of a Fly: The Genetics of Animal Design*. Oxford, Blackwell Scientific Publications
- Layalle, S., Volovitch, M., Mugat, B., Bonneaud, N., Parmentier, M. L., Prochiantz, A., . . . Maschat, F.** (2011). Engrailed homeoprotein acts as a signaling molecule in the developing fly. *Development*. **138**, 2315-2323
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. y Vogelstein, B.** (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. **396**, 643-649
- Lesaffre, B., Joliot, A., Prochiantz, A. y Volovitch, M.** (2007). Direct non-cell autonomous Pax6 activity regulates eye development in the zebrafish. *Neural Dev*. **2**, 2
- Litt, M. D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C. D. y Felsenfeld, G.** (2001). Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science*. **293**, 2453-2455
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. **25**, 402-408
- Lu, B. Y., Emtage, P. C., Duyf, B. J., Hilliker, A. J. y Eissenberg, J. C.** (2000). Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in Drosophila. *Genetics*. **155**, 699-708
- Lu, J. y Gilbert, D. M.** (2007). Proliferation-dependent and cell cycle regulated transcription of mouse pericentric heterochromatin. *J Cell Biol*. **179**, 411-421
- Mansouri, A., Goudreau, G. y Gruss, P.** (1999). Pax genes and their role in organogenesis. *Cancer Res*. **59**, 1707s-1709s; discussion 1709s-1710s
- Martin, C. y Zhang, Y.** (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **6**, 838-849
- Mason, J. M., Frydrychova, R. C. y Biessmann, H.** (2008). Drosophila telomeres: an exception providing new insights. *Bioessays*. **30**, 25-37
- Maulbecker, C. C. y Gruss, P.** (1993). The oncogenic potential of Pax genes. *EMBO J*. **12**, 2361-2367
- McKnight, S. L. y Miller, O. L., Jr.** (1976). Ultrastructural patterns of RNA synthesis during early embryogenesis of Drosophila melanogaster. *Cell*. **8**, 305-319
- Morata, G. y Martin, F. A.** (2007). Cell competition: the embrace of death. *Dev Cell*. **13**, 1-2

- Morata, G. y Ripoll, P.** (1975). Minutes: mutants of drosophila autonomously affecting cell division rate. *Dev Biol.* **42**, 211-221
- Morin, G. B.** (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell.* **59**, 521-529
- Muratovska, A., Zhou, C., He, S., Goodyer, P. y Eccles, M. R.** (2003). Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. *Oncogene.* **22**, 7989-7997
- Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D. y Grewal, S. I.** (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science.* **292**, 110-113
- Noma, K., Allis, C. D. y Grewal, S. I.** (2001). Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science.* **293**, 1150-1155
- Olovnikov, A. M.** (1971). [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Akad Nauk SSSR.* **201**, 1496-1499
- Palm, W. y de Lange, T.** (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet.* **42**, 301-334
- Pardue, M. L., Danilevskaya, O. N., Lowenhaupt, K., Wong, J. y Erby, K.** (1996). The gag coding region of the Drosophila telomeric retrotransposon, HeT-A, has an internal frame shift and a length polymorphic region. *J Mol Evol.* **43**, 572-583
- Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., Dompe, N. A., Fawcett, R., Huppert, K., . . . Francis-Lang, H. L.** (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the Drosophila melanogaster genome. *Nat Genet.* **36**, 288-292
- Perrini, B., Piacentini, L., Fanti, L., Altieri, F., Chichiarelli, S., Berloco, M., . . . Pimpinelli, S.** (2004). HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in Drosophila. *Mol Cell.* **15**, 467-476
- Petrella, L. N., Smith-Leiker, T. y Cooley, L.** (2007). The Ovhts polyprotein is cleaved to produce fusome and ring canal proteins required for Drosophila oogenesis. *Development.* **134**, 703-712
- Pich, U. y Schubert, I.** (1998). Terminal heterochromatin and alternative telomeric sequences in Allium cepa. *Chromosome Res.* **6**, 315-321
- Pritchard, D. K. y Schubiger, G.** (1996). Activation of transcription in Drosophila embryos is a gradual process mediated by the nucleocytoplasmic ratio. *Genes Dev.* **10**, 1131-1142

- Probst, A. V., Okamoto, I., Casanova, M., El Marjou, F., Le Baccon, P. y Almouzni, G.** (2010). A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev Cell*. **19**, 625-638
- Pryde, F. E., Gorham, H. C. y Louis, E. J.** (1997). Chromosome ends: all the same under their caps. *Curr Opin Genet Dev*. **7**, 822-828
- Raffa, G. D., Cenci, G., Siriaco, G., Goldberg, M. L. y Gatti, M.** (2005). The putative *Drosophila* transcription factor *woc* is required to prevent telomeric fusions. *Mol Cell*. **20**, 821-831
- Raffa, G. D., Ciapponi, L., Cenci, G. y Gatti, M.** (2011). Terminin: a protein complex that mediates epigenetic maintenance of *Drosophila* telomeres. *Nucleus*. **2**, 383-391
- Rauskolb, C., Peifer, M. y Wieschaus, E.** (1993). *extradenticle*, a regulator of homeotic gene activity, is a homolog of the homeobox-containing human proto-oncogene *pbx1*. *Cell*. **74**, 1101-1112
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., . . . Jenuwein, T.** (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. **406**, 593-599
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. y Bonner, W.** (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev*. **12**, 162-169
- Ried, T., Heselmeyer-Haddad, K., Blegen, H., Schrock, E. y Auer, G.** (1999). Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer*. **25**, 195-204
- Rieder, C. L. y Maiato, H.** (2004). Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev Cell*. **7**, 637-651
- Robson, E. J., He, S. J. y Eccles, M. R.** (2006). A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat Rev Cancer*. **6**, 52-62
- Rudolph, T., Yonezawa, M., Lein, S., Heidrich, K., Kubicek, S., Schafer, C., . . . Reuter, G.** (2007). Heterochromatin formation in *Drosophila* is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Mol Cell*. **26**, 103-115
- Sakurai, H., Okado, M., Ito, F. y Kawasaki, K.** (2011). Anaphase DNA bridges induced by lack of RecQ5 in *Drosophila* syncytial embryos. *FEBS Lett*. **585**, 1923-1928
- Salvany, L., Aldaz, S., Corsetti, E. y Azpiazu, N.** (2009). A new role for *hth* in the early pre-blastodermic divisions in *drosophila*. *Cell Cycle*. **8**, 2748-2755

- Salvany, L., Requena, D. y Azpiazu, N.** (2012). Functional association between eyegone and HP1a mediates wingless transcriptional repression during development. *Mol Cell Biol.* **32**, 2407-2415
- Savitsky, M., Kravchuk, O., Melnikova, L. y Georgiev, P.** (2002). Heterochromatin protein 1 is involved in control of telomere elongation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol.* **22**, 3204-3218
- Silva-Sousa, R., Lopez-Panads, E. y Casacuberta, E.** (2012). *Drosophila* telomeres: an example of co-evolution with transposable elements. *Genome Dyn.* **7**, 46-67
- Staller, M. V., Yan, D., Randklev, S., Bragdon, M. D., Wunderlich, Z. B., Tao, R., . . . Perrimon, N.** (2013). Depleting gene activities in early *Drosophila* embryos with the "maternal-Gal4-shRNA" system. *Genetics.* **193**, 51-61
- Stephens, G. E., Craig, C. A., Li, Y., Wallrath, L. L. y Elgin, S. C.** (2004). Immunofluorescent staining of polytene chromosomes: exploiting genetic tools. *Methods Enzymol.* **376**, 372-393
- Sunkel, C. E., Gomes, R., Sampaio, P., Perdigao, J. y Gonzalez, C.** (1995). Gamma-tubulin is required for the structure and function of the microtubule organizing centre in *Drosophila* neuroblasts. *EMBO J.* **14**, 28-36
- Tadros, W. y Lipshitz, H. D.** (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development.* **136**, 3033-3042
- Usakin, L., Abad, J., Vagin, V. V., de Pablos, B., Villasante, A. y Gvozdev, V. A.** (2007). Transcription of the 1.688 satellite DNA family is under the control of RNA interference machinery in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Genetics.* **176**, 1343-1349
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S. I. y Moazed, D.** (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science.* **303**, 672-676
- Villaescusa, J. C., Buratti, C., Penkov, D., Mathiasen, L., Planaguma, J., Ferretti, E. y Blasi, F.** (2009). Cytoplasmic Prep1 interacts with 4EHP inhibiting Hoxb4 translation. *PLoS One.* **4**, e5213
- Volpe, T., Schramke, V., Hamilton, G. L., White, S. A., Teng, G., Martienssen, R. A. y Allshire, R. C.** (2003). RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Res.* **11**, 137-146
- Volpe, T. A., Kidner, C., Hall, I. M., Teng, G., Grewal, S. I. y Martienssen, R. A.** (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science.* **297**, 1833-1837

- Waddington, C. H.** (1939). Preliminary Notes on the Development of the Wings in Normal and Mutant Strains of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **25**, 299-307
- Wang, Q., Fang, W. H., Krupinski, J., Kumar, S., Slevin, M. y Kumar, P.** (2008). Pax genes in embryogenesis and oncogenesis. *J Cell Mol Med*. **12**, 2281-2294
- Watson, J. D.** (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*. **239**, 197-201
- Weiss, M. M., Kuipers, E. J., Postma, C., Snijders, A. M., Stolte, M., Vieth, M., . . . Meijer, G. A.** (2003). Genome wide array comparative genomic hybridisation analysis of premalignant lesions of the stomach. *Mol Pathol*. **56**, 293-298
- Wizenmann, A., Brunet, I., Lam, J. S., Sonnier, L., Beurdeley, M., Zarbalis, K., . . . Prochiantz, A.** (2009). Extracellular Engrailed participates in the topographic guidance of retinal axons in vivo. *Neuron*. **64**, 355-366
- Xu, T. y Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development*. **117**, 1223-1237
- Yamada, T., Fischle, W., Sugiyama, T., Allis, C. D. y Grewal, S. I.** (2005). The nucleation and maintenance of heterochromatin by a histone deacetylase in fission yeast. *Mol Cell*. **20**, 173-185
- Yamaoka, T., Yano, M., Yamada, T., Matsushita, T., Moritani, M., li, S., . . . Itakura, M.** (2000). Diabetes and pancreatic tumours in transgenic mice expressing Pax 6. *Diabetologia*. **43**, 332-339
- Yao, J. G. y Sun, Y. H.** (2005). Eyg and Ey Pax proteins act by distinct transcriptional mechanisms in *Drosophila* development. *EMBO J*. **24**, 2602-2612
- Yao, J. G., Weasner, B. M., Wang, L. H., Jang, C. C., Weasner, B., Tang, C. Y., . . . Kumar, J. P.** (2008). Differential requirements for the Pax6(5a) genes eyegone and twin of eyegone during eye development in *Drosophila*. *Dev Biol*. **315**, 535-551
- Yasuda, G. K., Baker, J. y Schubiger, G.** (1991). Temporal regulation of gene expression in the blastoderm *Drosophila* embryo. *Genes Dev*. **5**, 1800-1812

A

nexo I: figuras suplementarias

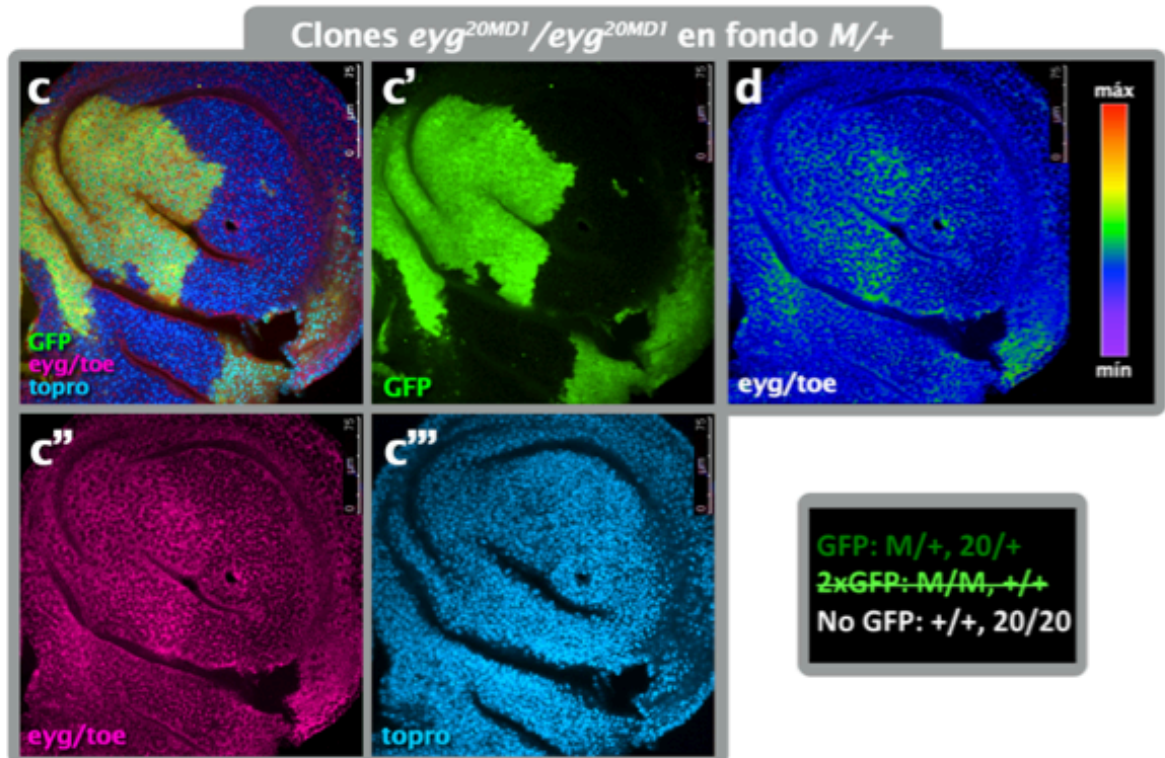
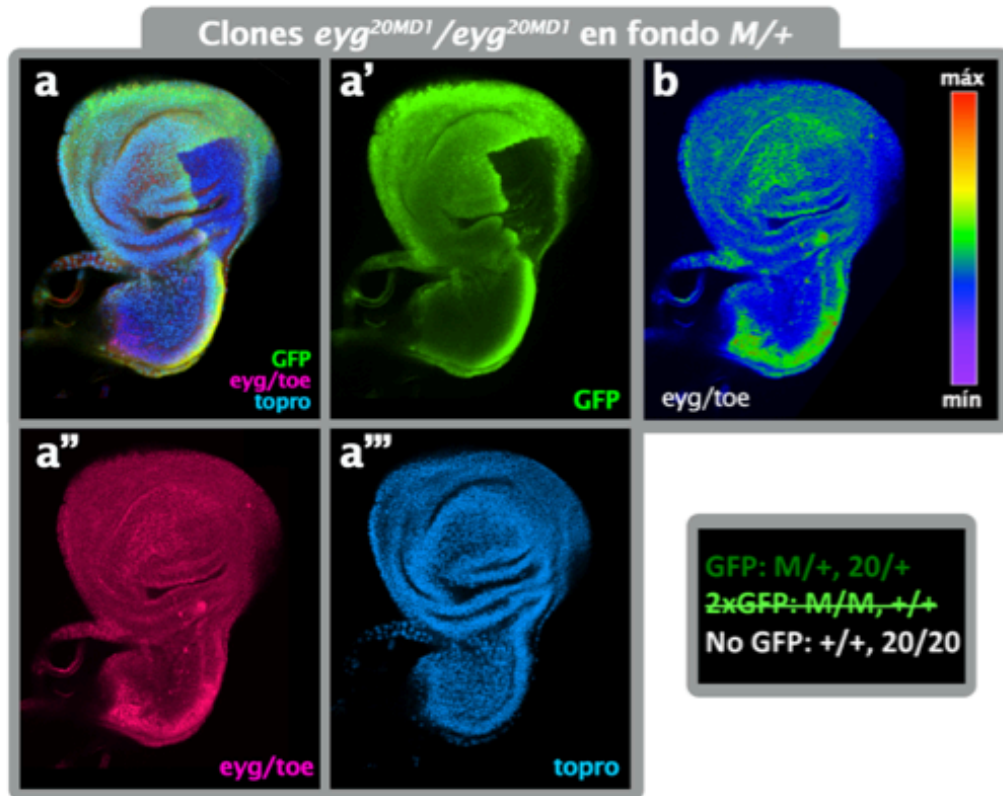


Figura suplementaria. S-1. Expresión citoplasmática basal de *Eyg* y *Toe* en discos imaginales de ala. Tinciones inmunohistoquímicas de discos imaginales de larvas de tercer estadio en los que generamos clones de recombinación mitótica *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1} en fondo *Minute/+*. Las células con una dosis de GFP (verdes en a' y c') son heterocigóticas para *Minute* (*M*) y para *eyg*^{20MD1}. Las células que no presentan GFP (no GFP en a' y c') son silvestres para *M* y son las correspondientes a los clones mutantes *eyg*^{20MD1}/*eyg*^{20MD1}. Y las células que vendrían identificadas por doble dosis de GFP mueren y serían aquellas homocigóticas para *M* (por ello no sobreviven) y silvestres para *eyg*^{20MD1}. En los discos observamos que las células homocigóticas para *eyg*^{20MD1} presentan una reducción de la señal del anticuerpo α -*Eyg/Toe* respecto a las heterocigóticas (rojo en a'' y c''). El ADN está teñido con topro. En b y d se observan los discos teñidos con α -*Eyg/Toe* en una escala de colores alternativa que muestra las regiones de mayor señal de proteína en verde y la de menos señal de proteína en azul.

A

nexo II: abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARN-i	ARN interferente
ARN-sh	ARN <i>short hairpin</i>
<i>eyg</i>	<i>eyegone</i>
CID	<i>Centromere Identifier Protein</i>
HP1	<i>Heterochormatin Protein 1</i>
<i>hth</i>	<i>homothorax</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
<i>mat</i>⁻	mutante materno
PD	<i>Paired Domain</i>
pb	pares de bases
PEV	<i>Position Effect Variegation</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
TAS	<i>Telomere Associated Sequences</i>
TEP	<i>Telomere Possition Effect</i>
<i>toe</i>	<i>twin of eyegone</i>
<i>twi</i>	<i>twist</i>
<i>wg</i>	<i>wingless</i>
<i>wt</i>	<i>wild type</i>

A

nexo III: publicaciones

Durante el desarrollo de este trabajo, el doctorando ha publicado el siguiente artículo, que no ha formado parte de este manuscrito y en el que figura como co-autor:

- **Salvany, L., Requena, D. y Azpiaz, N.** (2012). Functional association between eyegone and HP1a mediates wingless transcriptional repression during development. *Mol Cell Biol.* **32**, 2407-2415

